

ANNALES

DE

L'INSTITUT PASTEUR

MUTATIONS D'UNE SOUCHE DE *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* VERS LA RÉSISTANCE A L'ÉRYTHROMYCINE AVEC PERTE DE PROPHAGES

par R. WAHL et J. FOUACE (*).

(*Institut Pasteur*)

Nous avons constaté chez une souche de *Staphylococcus aureus* l'association de mutations vers la résistance à l'érythromycine, avec des pertes de prophages [7].

Nous étudions ici les relations entre ces deux mutations et l'effet des relaysogénisations des souches mutées.

MATÉRIEL ET MÉTHODES.

I. MILIEUX DE CULTURE. — Ce sont :

1° Une eau peptonée (peptone Uclaf) à 2,5 p. 100, glucosée à 0,3 p. 100, pour la préparation des phages ;

2° La même, mais non glucosée, gélosée à 1,5 p. 100, pour l'étude de l'activité des phages et les lysogénisations ;

3° Un bouillon à l'extrait Liebig, peptoné, tamponné, gélosé à 2 p. 100, pour la conservation des souches ;

(*) Manuscrit reçu le 21 décembre 1960.

Annales de l'Institut Pasteur, 100, n° 5, 1961.

4° Le même bouillon, non gélosé, érythromyciné, sert au titrage de la résistance à l'érythromycine ;

5° Un bouillon, macération de viande et peptone, préparé au laboratoire par digestion trypsique de viande, gélosé à 1,5 p. 100, pour l'étude de la résistance à l'érythromycine.

Les pH de tous les milieux sont ajustés entre 7 et 7,4. L'érythromycine est ajoutée en solution alcoolique aux milieux. La gélose est liquéfiée et ramenée à 45° au moment de cette addition.

II. EVALUATION DE LA RÉSISTANCE A L'ÉRYTHROMYCINE. — Elle est évaluée conventionnellement par l'épreuve suivante (épreuve du bouillon érythromyciné) :

Ensemencement de 10^7 bact/ml provenant d'une culture de 18 heures faite dans le bouillon à l'extrait Liebig décrit ci-dessus, contenant diverses concentrations d'érythromycine. Avec les doses auxquelles la souche est résistante, une culture de même opacité qu'en l'absence d'érythromycine se développe en dix-huit heures. On note la dose maxima (en $\mu\text{g/ml}$) à laquelle la souche donne une telle culture. Nous dirons, pour abrégé, que la souche est « résistante » à cette dose.

Une telle souche est partiellement ou totalement sensible aux doses plus élevées d'érythromycine en ce sens que la croissance en dix-huit heures est faible si l'on augmente tant soit peu la dose et bientôt nulle si on l'augmente davantage (1).

Si, au contraire, les conditions de l'épreuve sont modifiées en ce qui concerne le milieu de culture, le nombre de bactéries ensemencées, le pH, les résultats sont différents.

Si l'ensemencement est plus faible, la culture peut être retardée ou inhibée par des doses d'érythromycine inférieures à celles qui ont été déterminées par l'épreuve précédente ; et s'il est plus grand, on obtient une croissance avec des concentrations d'érythromycine plus élevées. Il est vrai que, dans ce dernier cas, la croissance est faible et lente et qu'il s'agit de bactéries de résistance plus grande que celle de l'ensemble de la population.

Si le pH est inférieur à 7, on obtient pour le même ensemencement des cultures avec des doses d'érythromycine plus fortes. Nous reviendrons sur ce point dans une prochaine publication.

Sur gélose (plaques de 10 cm) contenant la concentration d'érythromycine à laquelle la souche est résistante, après ensemencement de 10^7 bactéries d'une culture de 18 heures, étalées régulièrement, une culture abondante, en nappe, se développe.

Avec les concentrations auxquelles la souche est sensible, aucune culture ne se développe en dix-huit heures, quel que soit l'ensemencement. Les jours suivants des colonies résistantes peuvent apparaître, mais seulement quand le nombre de bactéries ensemencées est supérieur à 10^7 . Les stries sur gélose à l'érythromycine donnent des résultats irréguliers, difficiles à interpréter.

(1) Après dix-huit heures, comme nous le verrons, la situation se modifie. Après quarante-huit heures, on observe une faible croissance bactérienne qui progresse légèrement les jours suivants.

III. RÉACTIONS AUX PHAGES. — 1° *Phages utilisés*. — Ce sont les suivants que nous classons ainsi :

Groupe I : 29, 31, 52, 52A.

Groupe II : 3A, 3B, 3C, 51.

Groupe III : 6, 7, 44, 47, 53, 54.

Groupe IV : 42B, 42C, 42D, 42E, 47B, 47C.

Phages n'appartenant à aucun groupe : 47A, 68.

Cette classification est celle que nous avons indiquée dans des publications antérieures [6], un peu modifiée. Elle est différente, en ce qui concerne la répartition des phages entre le groupe III et le groupe IV, de celle qui est recommandée par la Sous-Commission Internationale de Lysotypie des Staphylocoques. Rappelons que nous avons constaté que les lysats des « phages 52 et 52A » contiennent en réalité deux phages différents. Nous les avons cependant utilisés tels quels.

Tous ces phages ont été isolés, à l'origine, de souches lysogènes, et sont donc des phages tempérés.

2° *Activité des phages sur les souches*. — Les lysats sont préparés sur la souche de propagation correspondante, puis stérilisés par le thymol et titrés chacun sur sa souche de propagation respective. Leur titre varie suivant les phages de 1×10^{10} à 4×10^8 /ml. Pour les expériences ils sont ramenés tous par dilution au titre de 10^8 ph/ml (« phages standard »). Pour évaluer l'activité d'un de ces phages sur une autre souche que la souche de propagation, ou ce qui revient au même, la réceptivité (2) de cette souche à ce phage, on étale avec celle-ci, sous un volume déterminé, des dilutions de 10 en 10 du phage standard jusqu'à l'obtention de plages distinctes, ce qui permet de calculer le nombre de phages actifs contenus dans 1 ml de phage standard. En divisant ce nombre par 10^8 on obtient un nombre inférieur ou égal à 1 qui exprime l'activité du phage sur la souche (son activité sur la souche de propagation étant prise pour unité), ou la réceptivité de la souche au phage. Si le « phage standard » ne donne aucune plage sur la souche, nous dirons qu'elle est réfractaire à ce phage.

Sur beaucoup de souches de staphylocoques, plusieurs « phages standard » produisent quelques plages, de façon intermittente. Nous considérerons de telles attaques comme négligeables et nous dirons que ces souches sont également réfractaires à ces phages. Il est possible que certaines de ces attaques au moins soient dues à des phages produits par induction spontanée de souches de propagation, qui sont elles-mêmes lysogènes, et que d'autres correspondent à des infections par des mutants de phages.

Notons que les phages tempérés du staphylocoque se fixent généralement aussi bien sur les souches réfractaires que sur les souches réceptives et que c'était bien le cas pour les phages et les souches que nous avons utilisés.

(2) Pour éviter toute confusion nous emploierons les termes de réceptivité et d'état réfractaire aux phages, et ceux de sensibilité et de résistance à l'antibiotique.

IV. INDUCTIONS LYSOGÉNIQUES. — Elles ont été obtenues par les rayons U.-V. suivant la méthode de Lwoff [5].

Nous avons utilisé la lampe germicide Mazda T 16 donnant à 60 cm de la lampe un éclairage énergétique de 100 microwatts par centimètre carré.

Les doses nécessaires à l'induction du staphylocoque sont relativement fortes. Nous avons dû irradier pendant deux ou trois minutes en milieu liquide, suivant le milieu utilisé (Ringer en eau peptonée). Parfois, on a fait des irradiations à travers la gélose, ce qui a nécessité des doses plus fortes (douze minutes à la même distance).

V. LYSOGÉNISATIONS. — Elles sont faites sur milieu solide, en incubation à 30°. Les bactéries lysogénisées forment dans certains cas des colonies macroscopiques dans la zone de lyse. Dans d'autres cas, la lyse paraît totale ; mais l'expérience a montré que, même alors, des bactéries ont été lysogénisées et ont survécu. Les bactéries survivantes, que des colonies soient visibles ou non, sont reprises avec de l'eau peptonée dans la zone lysée. Ce liquide est étalé sur gélose à diverses dilutions, de façon à obtenir des colonies séparées, éprouvées au point de vue de la lysogénicité.

Sur cet étalement, le nombre des colonies n'est pas toujours en rapport avec la dilution. Elles peuvent être moins nombreuses aux faibles dilutions qu'aux dilutions moyennes, parfois même il n'y a pas de colonies aux faibles dilutions. On ne sait s'il s'agit d'une lyse à nouveau ou d'une bactériostase.

La mise en évidence de l'état lysogène est faite toujours comparativement par quatre méthodes, car l'une ou l'autre peut être dans certains cas en défaut, pour des raisons techniques.

1° La recherche de l'état réfractaire pour le phage lysogénisant. Si le lysat utilisé pour la lysogénisation contient deux phages actifs sur la souche, les résultats diffèrent suivant les concentrations respectives de ces phages. Trois cas sont possibles : ou bien un seul lysogénise et la souche lysogénisée reste sensible à l'autre de sorte que le lysat produit encore des plages très nombreuses sur elle, ou bien les deux phages du lysat lysogénisent des bactéries différentes, ou bien ils lysogénisent les mêmes bactéries. Dans ces deux derniers cas, le lysat devient inactif sur la souche.

2° La réplique suivant la méthode de Lederberg [4] sur une gélose ensemencée avec la souche originelle. Les colonies lysogènes pour la souche de fond sont généralement entourées d'une zone de lyse ; mais celle-ci peut faire défaut si la souche a été lysogénisée par un phage qui donne des plages floues sur la souche originelle.

3° La méthode de Fisk [4] entre la souche lysogénisée et la souche originelle, où les plages peuvent être difficiles à voir.

4° La production de plages sur la souche originelle par le lysat résultant de l'irradiation par les rayons U.-V. de la souche lysogénisée quand le prophage greffé est inductible.

RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX.

I. — Souche originelle (souche O).

Cette souche de *St. pyogenes* a été isolée d'une hémoculture de septicémie et nous a été confiée par le D^r Chabbert, qui en avait isolé des mutants résistants, et que nous remercions vivement. Elle a les caractères suivants :

1° ELLE EST SENSIBLE A 0,5 µg/ml D'ÉRYTHROMYCINE, dans le sens de l'épreuve définie précédemment.

2° ELLE EST RÉCEPTIVE A SIX DES PHAGES UTILISÉS. — L'activité des « phages standard » sur la souche a été déterminée de la façon indiquée plus haut (par 52 titrages, dont 34 sur la souche globale et 18 sur des cultures provenant chacune de différents clones).

Quatre phages ont donné des résultats identiques à tous les titrages :

52 et 52A : 10^7 phages actifs/ml (activité 10^{-1}) ;

42B : 10^3 phages actifs/ml (activité 10^{-5}) ;

47C : 10^5 phages actifs/ml (activité 10^{-3}).

Deux autres phages, 42C et 42D, ont donné des plages moins constamment (40 et 70 p. 100 des cas) avec une activité de 10^{-4} . La souche doit être considérée comme réfractaire aux autres phages utilisés.

Ceci est évident pour les phages 53 et 54 qui n'ont jamais donné de plages sur elle. Mais, c'est vrai également des autres phages qui donnent sur elle, dans 10 à 20 p. 100 des cas, quelques plages (10^1 à 10^2 phages actifs/ml), soit sur l'ensemble de la souche, soit sur certains clones isolés. Nous avons vu pourquoi on ne doit pas en tenir compte.

3° ELLE EST DOUBLEMENT LYSOGÈNE. — Elle porte deux prophages *x* et *y*. L'induction par les U. V. donne un lysat (lysat O) qui contient les deux phages X et Y. Ces phages n'appartiennent à aucun des types sérologiques pour lesquels nous avons des sérums spécifiques à notre disposition, c'est-à-dire le groupe A (phages 52B...), le groupe B (phages 29, 29A, 52 et 52A) et le groupe D (phage 68). Ils se distinguent l'un de l'autre, comme nous le verrons, par leur action sur les mutants de la souche O. On n'a pas trouvé de souches réceptives à ces phages en dehors de ces mutants.

La sensibilité à l'érythromycine et le comportement de la souche O vis-à-vis des phages sont des caractères stables.

II. — *Isolement des mutants résistants.*

La mutation vers la résistance à l'érythromycine, de même type que vers la résistance à la streptomycine, se fait en un petit nombre d'échelons. Pour la souche O, deux échelons ont été observés. Les mutants du premier échelon sont résistants à 3 $\mu\text{g/ml}$, ceux du deuxième échelon à 100 $\mu\text{g/ml}$.

1° MUTANTS RÉSISTANTS DE PREMIER ÉCHELON. — Les premiers ont été isolés par des ensemencements de 5×10^8 à 1×10^{10} bactéries sur une plaque de gélose de 10 cm de diamètre contenant diverses concentrations d'érythromycine, entre 0,5 et 4 $\mu\text{g/ml}$.

Une partie seulement des colonies survivantes sont des clones de mutants résistants, d'autres sont composées de bactéries à résistance instable qui seront étudiées dans une autre publication, d'autres enfin sont mixtes.

A partir de plusieurs de ces colonies, on fait des ensemencements peu denses sur gélose sans érythromycine, de façon à obtenir des colonies séparées.

On évalue la résistance des populations provenant de plusieurs colonies par l'épreuve du bouillon érythromyciné. Les populations de mutants sont caractérisées par leur résistance stable et homogène à 3 $\mu\text{g/ml}$ d'érythromycine. C'est-à-dire qu'elle subsiste sans changement après des subcultures sans érythromycine, quel que soit leur nombre, la densité de l'ensemencement et le milieu, et que tous les clones de ces populations ont la même résistance. Au contraire, chez les bactéries à résistance instable, la résistance se perd en un petit nombre de subcultures, en milieu solide ou liquide. A partir des colonies mixtes, on obtient des colonies de mutants et des colonies à résistance instable.

2° MUTANTS RÉSISTANTS DE DEUXIÈME ÉCHELON. — En ensementant 10^{11} ou 10^{12} bactéries d'une population de premier échelon sur des plaques de gélose contenant 100 $\mu\text{g/ml}$ d'érythromycine ou davantage, on obtient de rares colonies représentant deux catégories de populations :

Les unes ont une résistance instable à 100 $\mu\text{g/ml}$. Une subculture sur gélose sans érythromycine donne des colonies ayant conservé seulement la résistance stable à 3 $\mu\text{g/ml}$.

Les autres, obtenues par Chabbert, ont une résistance stable à 100 $\mu\text{g/ml}$ d'érythromycine (toujours selon l'épreuve du bouillon érythromyciné). Elles sont homogènes : différents clones issus chacun d'une colonie différente ont la même résistance à l'érythromycine. Ce sont des mutants de deuxième échelon.

III. — *Comportement vis-à-vis des phages de populations contenant des mutants.*

Chacune des deux mutations est associée à une modification du comportement vis-à-vis des phages. On les a étudiées spécialement sur deux souches : la souche I, isolée à partir d'un clone de mutants de premier échelon, résistant à 3 $\mu\text{g/ml}$; la souche II, provenant d'un clone de mutants de deuxième échelon, résistant à 100 $\mu\text{g/ml}$.

1° POPULATIONS DE MUTANTS DU PREMIER ÉCHELON. — a) *Réceptivité aux phages.* La souche I est devenue réceptive au phage X et reste résistante au phage Y. En effet, le lysat O donne des plages sur la souche I, alors que celle-ci, comme nous le verrons, possède encore le prophage *y*. En passant plusieurs fois le lysat O sur la souche I, on isole le phage X.

En même temps, elle est devenue réceptive aux « phages standard » 29 (Réceptivité 10^{-1}), 31 (Réc. 10^{-2}), 42E (Réc. 10^{-4}), 47 (Réc. 10^{-4}), 47B (Réc. 10^{-3}), phages auxquels la souche originelle est résistante ; par contre, les « phages standard » 42C et 42D, qui ont une activité de 10^{-4} sur la souche O, ne donnent plus de plages sur la souche I. Une explication de ce paradoxe sera proposée à la discussion. Le nouveau type bactériophagique est stable, et les populations sont homogènes à ce point de vue ; tous les clones de mutants de premier échelon (à résistance stable) et tous les clones isolés dans la souche I se comportent de même.

b) *Lysogénie.* — L'action des U. V. provoque une lyse de la souche I. Le lysat (lysat I) contient le phage Y et non le phage X. Ce phage Y est probablement dans un état très instable, car ce lysat ne donne pas de plages (ou difficilement) sur la souche II qui a perdu les prophages *x* et *y*. La présence du phage Y dans ce lysat est démontrée des deux façons suivantes :

Le lysat est mélangé à une gélose molle, qui est ensuite coulée dans une cavité pratiquée dans la gélose ; le tout est recouvert d'une couche de gélose contenant la souche II. La couche bactérienne est lysée en face de la cavité contenant le phage.

On étale sur gélose une suspension légère de la souche I, de façon à obtenir des colonies séparées. Puis on coule une mince couche de gélose molle et on laisse dix-huit heures à 37°. On irradie pendant douze minutes, à 60 cm de la lampe à U. V. (lampe germicide Mazda). On coule par-dessus une seconde couche de gélose molle contenant une suspension dense de la souche II, de façon à obtenir une culture continue et on remet pendant cinq

heures à 37°, puis une nuit au laboratoire. Des zones de lyse se produisent dans la couche de la souche II, en face des colonies de la souche I.

c) *Lysogénisations*. — On a pu lysogéniser la souche I par le phage X, soit avec le lysat O, puisque la souche I est immune pour le phage Y présent également dans le lysat O, soit avec le phage X isolé par passages sur la souche I.

Les bactéries ainsi lysogénisées se comportent comme la souche O : outre qu'elles produisent les deux phages X et Y, auxquels elles sont redevenues résistantes, elles sont devenues lysogènes pour les souches I et II. Elles ont perdu totalement et en une fois la réceptivité aux phages 29, 31, 6, 7, 44, 47 et 47B et elles ont retrouvé en même temps le même degré de réceptivité que la souche O aux phages 42C et 42D ; enfin, elles sont redevenues sensibles à 0,5 µg/ml d'érythromycine.

Par ailleurs, la souche I a été lysogénisée par certains des autres phages auxquels elle était devenue sensible. La lysogénisation par un seul de ces phages lui fait perdre la réceptivité non seulement à celui-ci, mais à plusieurs autres. La lysogénisation de la souche I par le phage 29 ou par le phage 31, lui fait perdre la réceptivité aux deux phages 29, 31, à un des phages contenus dans les lysats 52, 52A et au phage X. Mais elle reste réceptive à 47B, 42E, 44 et 47 et résistante à 42C et 42D.

Les lysogénisations par les phages 29 et 31 ne modifient pas la résistance de la souche I à l'érythromycine.

On n'a pas pu lysogéniser la souche I par 42E (auquel elle est moins sensible que la souche II : dix fois au moins).

La souche I a donc perdu le prophage λ et en même temps, elle est devenue réceptive non seulement au phage X, mais à plusieurs autres phages. Inversement, la mise en place, après la perte du prophage λ , d'un autre prophage la rend réfractaire à plusieurs phages, mais qui ne sont pas tous les mêmes.

2° POPULATIONS DE MUTANTS DU DEUXIÈME ÉCHELON (souche II). — Le type de réaction aux phages de la souche II diffère aussi bien de celui de la souche initiale que de celui de la souche I.

a) *Réceptivité aux phages*. — La souche II a conservé la réceptivité acquise par les mutants du premier échelon pour le phage X et les autres phages indiqués ci-dessus. De plus, elle est devenue réceptive au phage Y, car les colonies de la souche I, recouvertes d'une gélose contenant la souche II, produisent dans celle-ci une zone de lyse.

Elle est devenue réceptive en même temps aux phages 42C (Récep-

tivité 10^{-2}), 42D (Réc. 10^{-2}), 6 (Réc. 10^{-3}), 7 (Réc. $9,7 \times 10^{-1}$), 53 (Réc. 10^{-4}), 54 (Réc. 10^{-4}).

b) *Lysogénie*. — On ne sait si la souche II possède encore un prophage. Elle se lyse par l'action des rayons U. V. On n'a pas pu trouver de souche détectrice indiquant que ce lysat contienne des phages.

c) *Lysogénisations*. — La souche II lysogénisée à la fois par les phages X et Y (par l'action du lysat O) reprend le type phagique de la souche initiale, c'est-à-dire qu'elle devient réfractaire, non seulement aux phages X et Y, mais aux phages 6, 7, 29, 31, 44, 47, 47B, 42E, 44A, 53 et 54. Toutes les bactéries sont doublement lysogénisées. Cette lysogénisation, à la différence de celle de la souche I par le phage X, ne modifie pas la résistance à l'érythromycine. La souche II ainsi lysogénisée produit les mêmes phages que la souche O ; ceux-ci peuvent à leur tour lysogéniser les souches I et II.

On peut aussi lysogéniser la souche II par le phage X seul, isolé par des passages à partir du lysat O, sur la souche I réfractaire au phage Y. La souche II ainsi lysogénisée reste sensible au phage Y. Mais elle est devenue réfractaire aux mêmes autres phages que lorsqu'elle est lysogénisée à la fois par les phages X et Y, c'est-à-dire aux mêmes phages que la souche O.

L'état réfractaire de la souche O à ces phages est donc dû exclusivement à la présence du prophage α .

On n'a pas pu entraîner le phage Y sur la souche II lysogénisée par X, ce qui aurait permis d'isoler le phage Y et de lysogéniser la souche II par le phage Y seul.

La lysogénisation de la souche II par un des phages 42C ou 42E la rend réfractaire aux trois phages 42D, 42C, 42E ; mais le prophage 42E bloque en plus la synthèse de 29, de 31 et de l'un des phages contenus dans les lysats 52 et 52A. La souche II reste, après lysogénisation par 42D, lysable et lysogénisable par le phage X (on n'a pas recherché si après la lysogénisation par 42C, il en était de même). On ne sait pas si elle est encore réceptive au phage Y puisqu'on n'a pas pu isoler celui-ci.

Ces lysogénisations ne modifient pas la résistance à l'érythromycine.

Nous avons étudié avec quelques détails le blocage de 42D chez la souche II (42C).

La souche II (42C) n'est naturellement plus lysable ni lysogénisable par 42C. Le phage 42D peut se fixer sur cette souche, bien que celle-ci ne puisse pas en faire la synthèse.

L'induction U. V. de la souche II (42C) qui a fixé 42D, produit

une lyse avec libération de phages 42C et non de phages 42D, mais avec libération d'une substance lytique active sur des souches résistantes à 42C et sensibles à 42D. En effet, le lysat ainsi obtenu produit sur gélose une lyse de la souche 86, et de la souche II (42C) elle-même. Il semble donc qu'il y ait eu greffe du prophage 42D sur la souche II (42C) avec lysogénie abortive pour 42D. Nous y reviendrons à la discussion.

La lysogénisation de la souche II par 29 bloque la synthèse de 29, 31 et d'un des phages contenus dans le lysat 52 et 52A, ainsi que celle de 42B et 47C (mais non de 42C) et la rend réfractaire aux phages X et Y.

La lysogénisation de la souche II par 42E ou 31 la rend réfractaire non seulement à ces mêmes phages, mais encore à 42C, 42D, 42E, 44, 47 mais non à 6 et 7.

Les lysogénisations par 29, 31, 42E bloquent donc un des phages des lysats 52 et 52A, à la différence des lysogénisations par 42C, 42D ou par les phages X et Y.

La lysogénisation par les lysats 52 ou 52A rend aussi la souche réfractaire à un des phages de ces lysats, mais ce n'est peut-être pas celui dont la synthèse est bloquée par les prophages correspondant aux phages précédents.

DISCUSSION.

I. — *Les colonies à résistance stable ne proviennent pas de contaminations des cultures.*

En effet, les bactéries à résistance stable conservent une partie des caractères de la souche O, étant réfractaires aux mêmes phages, ayant même résistance aux autres antibiotiques et redevenant réfractaires aux autres phages en récupérant les prophages perdus.

II. — *Caractères de la mutation.*

1° La mutation est démontrée par la stabilité des caractères, l'association à une autre modification génétique (perte de prophage), la transduction du caractère inverse (sensibilité à l'érythromycine).

La mutation se fait en un petit nombre d'échelons (deux seulement) comme dans le cas de la résistance à la streptomycine.

Les souches résistantes ne sont pas érythromycino-exigeantes.

2° L'érythromycine sélectionne les mutants. Elle ne paraît pas agir comme agent mutagène. Cependant, pour le prouver, il faudrait vérifier statistiquement que les taux de mutation sont indé-

pendants de la dose d'érythromycine, c'est-à-dire que la somme des colonies issues d'un mutant (colonies à résistance stable et colonies mixtes) est constante pour toutes les doses d'érythromycine inférieures ou égales à la dose de résistance maxima (3 μg ml dans le cas des mutants de premier échelon) et on pourrait s'attendre à ce qu'aucune de ces colonies n'existe au-dessus de cette dose. En réalité, cette vérification est impossible à cause de l'existence des colonies mixtes et de colonies de mutants chez lesquels une résistance instable s'est ajoutée à la résistance stable acquise par mutation.

3° L'érythromycine, non seulement sélectionne les mutants résistants, mais elle assure indirectement leur survie et leur croissance, en supprimant les bactéries sensibles, productrices de phages actifs sur les mutants.

4° Les mutations vers la résistance à l'érythromycine paraissent correspondre à la perte d'un gène conférant la sensibilité à l'érythromycine car on peut, par transduction, restituer à la souche I, résistante à 3 μg , la sensibilité à l'érythromycine.

Des transductions de la résistance à des antibiotiques sont connues et répondent probablement à l'apport d'un gène conférant cette résistance.

Il s'agirait ici d'un gène conférant la sensibilité. La mutation vers la résistance à 3 μg serait donc due à la perte d'un gène conférant la sensibilité aux doses comprises entre 0,5 et 3 μg et la souche serait résistante à 3 μg en présence de ce gène.

Cependant, ni la relysogénéisation simultanée par les phages X et Y, ni la relysogénéisation par le phage X seul ne transduisent à la souche II une sensibilité accrue à l'érythromycine. Ceci n'est pas incompatible avec l'hypothèse d'un second gène en rapport avec la sensibilité à l'érythromycine et dont la perte conférerait la résistance aux doses comprises entr 3 μg et 100 μg .

En effet, il est probable que le phage X ne peut abaisser, par transduction, la résistance, au-dessous de 0,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ que si celle-ci n'est pas supérieure à 3 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Il est possible que le phage Y ne puisse pas, par transduction, abaisser à 3 μg , la résistance de la souche II. Mais il est possible aussi que cette transduction soit réalisable par le phage Y seul et non par relysogénéisation simultanée par les deux phages. La question reste posée puisque la lysogénéisation par le phage Y seul n'a pas été obtenue.

5° La résistance des bactéries génotypiquement résistantes n'est complètement mise en évidence qu'avec desensemencements assez denses. La plupart des bactéries résistantes ne donnent pas de colonies quand elles sont dispersées sur la gélose. Ce phénomène sera étudié dans une prochaine publication.

III. — Blocage par un seul prophage de plusieurs synthèses de phages.

1° LA PERTE D'UN SEUL PROPHAGE REND LES MUTANTS RÉCEPTIFS A PLUSIEURS PHAGES. — Inversement, chacun des prophages de la souche O bloque la synthèse de ces phages, et toutes les lysogénisations de la souche I et de la souche II par un seul phage, c'est-à-dire mettant en place un seul prophage, bloquent la synthèse de plusieurs phages.

D'après Jacob et Campbell [2], un prophage est fixé sur un locus défini du chromosome, sans d'ailleurs interrompre sa continuité. De plus, sa présence est liée à l'existence d'un répresseur cytoplasmique qui bloque un temps initial de la synthèse du phage correspondant. Si l'inhibition est levée, par les U. V. par exemple, le prophage sert de point de départ à la synthèse des phages.

Le système prophage-répresseur n'empêche pas la pénétration de l'ADN d'un phage homologue, mais cet ADN ne peut ni déclencher la synthèse des phages à cause du répresseur, ni se fixer sur le chromosome, comme prophage, le locus correspondant étant occupé.

On doit se demander comment ce système peut aussi bloquer la synthèse d'un phage hétérologue. Prenons l'exemple de la souche II (42C) qui ne peut plus synthétiser le phage 42D.

Il est de règle que les phages tempérés des staphylocoques se fixent sur les souches qui leur sont réfractaires. En fait, le phage 42D se fixe sur la souche II (42C).

De plus, il semble que son ADN, au même titre que celui du phage homologue 42C doive pénétrer dans les bactéries II (42C). Cependant, la synthèse de ce phage ne se produit pas, à la suite de l'infection de cette souche par 42D. Le même répresseur inhibe probablement la synthèse de 42C et celle de 42D.

Mais ceci ne peut, si l'ADN de 42D a pénétré dans la bactérie, empêcher sa greffe sur le chromosome, le locus du prophage 42D étant libre. Et cependant, le lysat U. V. de la souche supposée doublement lysogénisée contient le seul phage 42C. On constate toutefois que ce lysat possède une activité lytique sur des souches résistantes à 42C et sensibles à 42D, c'est-à-dire sur les souches 86 et II (42C), activité lytique que ne possédait pas le lysat de la souche II (42C).

Ceci est bien en faveur d'une double lysogénisation, avec cette particularité que la souche II (42C, 42D) est capable de faire la synthèse complète de 42C alors que sa lysogénie pour 42D est abortive, aboutissant à la production d'une substance lytique ayant la même spécificité d'action que celle du phage 42D.

Les autres cas n'ont pas été étudiés ; on peut supposer qu'ils sont comparables.

2° LE BLOCAGE DE LA SYNTHÈSE DE PLUSIEURS PHAGES PAR UN SEUL PROPHAGE EST-IL DÙ A UN OU PLUSIEURS RÉPRESSEURS ? — Deux cas ont été observés :

a) Dans le premier cas, certains prophages bloquent réciproquement la synthèse des mêmes phages. Il est possible que ces prophages agissent par l'intermédiaire d'un seul et même répresseur, qui s'oppose à la synthèse d'une même enzyme qui intervient au début de la synthèse de tous ces phages.

C'est le cas de la lysogénisation de la souche I par les phages 29 et 31, de la lysogénisation de la souche II par les phages 42C ou 42D.

b) Dans le second cas, au blocage réciproque de la synthèse d'une même série de phages par deux prophages s'ajoute le blocage de la synthèse d'une autre série de phages par l'un d'entre eux ou de deux autres séries de phages, respectivement par chacun d'entre eux.

Dans ce cas, on peut supposer que chaque prophage provoque la synthèse de deux ou trois répresseurs. L'un commun, bloquant les phages de la série commune, l'autre, ou les autres, bloquant respectivement la synthèse de ces deux séries particulières.

Ainsi la lysogénisation de la souche I par le phage X, par le phage 29 ou par le phage 31 bloque la synthèse des phages X, 29 et 31. Mais la présence du prophage α bloque aussi la synthèse des phages 6, 7, 44, 47 et 47B ; alors que celle des prophages 29 et 31 bloque la synthèse de l'un des phages contenus dans les lysats 52 et 52A.

De même la lysogénisation de la souche II par les phages 42C, 42D, 42E ou par le phage Y bloque la synthèse de 42C, 42D et 42E, mais le prophage γ bloque en outre la synthèse de 6, 7, 53 et 54 ; tandis que le prophage 42E bloque en plus 29, 31, 52 et 52A.

La lysogénisation de la souche II par le phage 31 produit le même effet que la lysogénisation par 42E.

3° ETAT RÉFRACTAIRE APPARENT DE LA SOUCHE I AUX PHAGES 42C ET 42D PAR LA PERTE DU PROPHAGE α . — La perte de chaque prophage s'accompagne de l'acquisition de la sensibilité à plusieurs phages. Cependant l'échelon I qui a perdu le prophage α paraît être devenu paradoxalement réfractaire aux phages 42C et 42D, alors que ces phages produisent des plages sur la souche O. Ceci peut s'expliquer de la façon suivante :

La souche O serait en réalité réfractaire à ces deux phages eux-mêmes, comme la souche I. Mais les plages produites par eux sur la souche O seraient dues à un recombinant entre l'ADN de

ces phages et l'ADN synthétisé par les bactéries de la souche O dont le prophage x s'induit spontanément. La souche I ayant perdu ce prophage, ce recombinant ne se reforme plus.

La souche II deviendrait réellement sensible à ces phages eux-mêmes par perte du prophage y .

IV. — Association des pertes de prophage avec l'acquisition de résistance stable à l'érythromycine.

L'apparition simultanée à chacun des deux échelons de mutation, de la résistance à une certaine dose d'érythromycine et de la perte d'un prophage est analogue à l'acquisition par *E. coli* K12 de la résistance à la streptomycine associée à la perte d'un prophage (Lederberg [3]).

On aurait pu supposer que les mutants résistants sélectionnés par l'action de l'érythromycine seraient les uns pourvus de prophage, les autres sans prophage, et que l'érythromycine ferait disparaître les premiers par induction lysogénique.

Mais, l'érythromycine n'a pas une telle action : elle n'augmente pas le nombre de phages libres. Les essais d'induction de la souche O par de faibles doses d'érythromycine (de 1 à 5 $\mu\text{g/ml}$) ont échoué.

D'ailleurs, la présence de ces prophages est compatible avec la résistance stable à l'érythromycine, puisque la souche II lysogénisée par les phages X et Y récupère les prophages x et y , en gardant la résistance à l'érythromycine. Il s'agit donc de mutations associées, mais non obligatoirement liées.

Cependant, les essais d'isolement, en dehors de l'érythromycine (par action U. V. par exemple) de mutants sans prophage sensibles à l'érythromycine ont échoué. La nature des rapports entre ces deux mutations reste obscure.

La transduction de la sensibilité à l'érythromycine par le phage X à la souche I résistante à 3 μg , laisse supposer que le prophage est greffé en un point voisin du locus d'un gène en relation avec la réponse de la souche à l'érythromycine.

RÉSUMÉ

La mutation d'une souche de *Staphylococcus aureus* sensible à l'érythromycine vers la résistance à cet antibiotique se fait en deux échelons, caractérisés respectivement par la résistance à 3 μg et à 100 $\mu\text{g/ml}$ d'antibiotique. La souche sensible, qui est doublement lysogène, perd à chacune des mutations un de ses prophages. La perte de chaque prophage la rend capable de faire la synthèse non seulement du phage correspondant, mais de plusieurs autres.

La relysogénisation d'un mutant du premier échelon par le

phage correspondant au prophage qu'il a perdu le rend réfractaire aux mêmes phages que la souche initiale et transduit la sensibilité à l'érythromycine. La relysogénisation d'un mutant du deuxième échelon par les deux phages le rend aussi réfractaire aux mêmes phages que la souche initiale, mais le laisse résistant à 100 µg/ml d'érythromycine. Des lysogénisations de mutants par certains autres phages les rendent incapables de faire la synthèse de divers phages, différant de celui qui les a lysogénisés. Il semble cependant que l'ADN de ces derniers puisse se greffer sur le chromosome de la bactérie comme prophage, en créant une lysogénie abortive.

Chacun des deux échelons de résistance à l'érythromycine paraît résulter de la perte d'un gène, et l'un d'eux au moins peut être récupéré par transduction.

SUMMARY

MUTATIONS OF A STRAIN
OF *Staphylococcus aureus* TOWARDS ERYTHROMYCINO-RESISTANCE
WITH LOSSES OF PROPHAGES.

The mutations of an erythromycino-sensitive strain of *Staphylococcus aureus* towards resistance to erythromycin were achieved in two steps : resistance to 3 µg and resistance to 100 µg/ml.

The sensitive strain was doubly lysogenic and lost one prophage in each mutation.

This strain became able to synthesize not only the phage corresponding to the lost prophage, but also several other phages.

When the first step mutant is lysogenized with the phage corresponding to the lost prophage, it becomes, at the same time, resistant to the phages to which the original strain was resistant, and sensitive to erythromycin.

When the second step mutant is lysogenized with the two phages carried by the sensitive strain, it becomes resistant to all the phages to which the original strain is resistant, but this does not abolish the resistance to 100 µg/ml of erythromycin.

Lysogenizations of the mutants with a variety of other phages makes them unable to synthesize, not only the lysogenizing phage, but also different other phages.

However, the DNA of these other phages seems to be integrated in the bacterial chromosome as a prophage, creating an abortive lysogeny.

Each step of erythromycino-resistance seems to correspond to the loss of a gene and one of these genes at least can be reintroduced by transduction.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] FISK (R. T.). *J. inf. Dis.*, 1942, **71**, 153.
 - [2] JACOB (F.) et CAMPBELL (A.). *C. R. Acad. Sci.*, 1959, **248**, 3219.
 - [3] LEDERBERG (E. M.) et LEDERBERG (J.). *Genetics*, 1953, **38**, 51.
 - [4] LEDERBERG (J.) et LEDERBERG (E. M.). *J. Bact.*, 1952, **63**, 399.
 - [5] LWOFF (A.), SIMINOVITCH (L.) et KIELGAARD (N.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1950, **79**, 815.
 - [6] WAHL (R.) et FOUACE (J.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1952, **82**, 542.
 - [7] WAHL (R.) et FOUACE (J.). *Zbl. Bakt. I Orig.*, 1958, **170**, 573.
-

ÉTUDE IMMUNOCHIMIQUE DES HÉMOLYSATS DE GLOBULES ROUGES HUMAINS

IV. LES ESTÉRASES CARBOXYLIQUES ET UNE PROTÉASE

par A. MICHELI et P. GRABAR (*)

(Institut Pasteur, Service de Chimie Microbienne)

Dans des publications précédentes [21, 19, 16, 17] ont été exposés les résultats obtenus dans notre étude des hémolysats de globules rouges humains. Nous avons montré que, parmi les 9 lignes de précipitation obtenues en analyse immuno-électrophorétique à l'aide d'un immunosérum de lapin, deux correspondaient à l'hémoglobine (Hb et Hb') et qu'une troisième était due à la catalase. Dans l'un de ces travaux [17] nous avons rapporté brièvement nos résultats préliminaires concernant les estérases carboxyliques. Nous allons ici développer et compléter l'exposé de nos connaissances actuelles.

Les techniques histochimiques [2], adaptées à nos conditions d'expérience, devaient nous être de la plus grande utilité. Certaines de ces techniques ont été appliquées par Uriel [24] aux études d'électrophorèse et d'immuno-électrophorèse en gélose.

Nous nous en sommes tenus pour commencer à une classification sommaire des estérases carboxyliques : 1° cholinestérases (AChE dans les hématies, ChE dans le sérum); ali-estérases (ali-estérases et arom-estérases); 3° lipases (qui ne seront pas envisagées ici). La classification des enzymologistes est beaucoup plus subtile; elle est basée sur des spécificités de substrat, d'inhibiteurs et parfois de localisation.

MATÉRIEL.

Les globules rouges ont été prélevés par ponction veineuse sur citrate, chez des individus réputés normaux. Nous avons travaillé avec le sang de plusieurs sujets en les comparant, plutôt qu'avec un mélange de plusieurs sangs.

Les immunosérums utilisés ont été obtenus chez le lapin, d'abord par une série de trois injections sous-cutanées d'hémolysat complet

(*) Manuscrit reçu le 19 décembre 1960.

(Hem/c = contenu globulaire et stromas) avec adjuvants de Freund à une semaine d'intervalle, puis après dix jours une série de sept injections intraveineuses d'hémolysat à deux jours d'intervalle. Enfin, après un repos d'une semaine, les lapins furent saignés à blanc. Certains immunsérums de valeur presque identique ont été groupés. Nous les avons parfois concentrés, de 3 à 6 fois, par précipitation des γ -globulines au sulfate d'ammonium. Cela nous a permis d'obtenir en analyse immuno-électrophorétique la précipitation de constituants faiblement antigéniques.

Les immunsérums sont filtrés sur bougie, additionnés de merthiolate à 1/10 000 et répartis en ampoules de 1 à 2 ml conservées à -10° . Après leur ouverture, les ampoules sont conservées à $+4^{\circ}$.

MÉTHODES.

1° *Préparation des hémolysats sans stromas (Hem/ss).* — Les globules rouges sont séparés du plasma par centrifugation. Le culot globulaire est soumis à 6 lavages dans 10 volumes de NaCl 0,9 p. 100 à la température du laboratoire, suivis chaque fois d'une centrifugation à 2 000 t/min pendant dix minutes. Après la sixième centrifugation, un volume de culot globulaire est suspendu dans un égal volume d'eau distillée et on laisse reposer deux heures. On ajoute ensuite du NaCl jusqu'à une concentration finale de 0,45 p. 100. Puis on centrifuge une heure à 10 000 t/min à froid. On prélève soigneusement le surnageant limpide et sans stromas (Hem/ss). Celui-ci est conservé à $+4^{\circ}$.

2° *Préparation d'une suspension de stromas.* — Le culot recueilli par la centrifugation à 10 000 t/min est lavé lui aussi six fois alternativement avec 10 volumes de NaCl 0,9 p. 100 et 10 volumes d'eau distillée. La dernière eau de lavage est rose pâle, tandis que le culot de stromas est rouge foncé. Celui-ci peut être alors mis en suspension dans du NaCl 0,9 p. 100 en prévision des traitements ultérieurs.

3° *Extraction par l'alcool butylique.* — Nous nous sommes inspirés de la méthode utilisée par Morrison et Neurath [48]. L'extraction se fait à partir de la suspension de stromas.

4° *Extraction par l'alcool éthylique + chloroforme.* — Cette technique, selon Tsuchihashi [23], aboutit à la dénaturation apparemment sélective de l'hémoglobine par l'addition à 5 parties d'hémolysat, de 4 parties d'alcool éthylique à 40 p. 100 et de 2 parties de chloroforme.

5° *Electrophorèses.* — L'analyse immuno-électrophorétique (AIE) de Grabar et Williams [44] a été pratiquée selon la microméthode de Scheidegger [22] légèrement modifiée, en ce sens que nous avons utilisé une gouttière à antisérum plus longue (56 mm) et une tension plus forte (8 V/cm pendant quarante-cinq minutes) ce qui donne une meilleure séparation quand les antigènes sont nombreux comme dans

le plasma. Les électrophorèses simples en gélose ont été faites dans des conditions semblables. Le tampon véronal est de pH 8,2 et de force ionique 0,05 μ dans les bacs, de 0,025 μ dans la gélose.

6° *Colorations simples.* — Les analyses immuno-électrophorétiques, après lavage en deux jours et dessiccation, sont colorées pendant cinq minutes dans une solution de rouge ponceau (Geigy) à 0,2 p. 100 dans de l'acide acétique à 5 p. 100. Pour les électrophorèses simples, nous utilisons le noir amide (amidoschwarz Geigy) à 0,1 p. 100 en solution aqueuse acétique à 5 p. 100.

7° *Colorations enzymatiques spécifiques.* — Des techniques pour les estérases carboxyliques après électrophorèse en gélose sont décrites par Uriel [24]. Nous avons appliqué la méthode qu'il indique utilisant comme substrat l'acétate de β -naphthyle. Pour la caractérisation de l'acétylcholinestérase (AChE) nous avons essayé la technique à l'acétylthiocholine que décrit Uriel, ainsi que la technique de Koelle-Coërs modifiée par Gerebtzoff [10] et la technique de Crevier et Bélanger [5] dont le principe est différent. Ces colorations ont été utilisées aussi bien dans les électrophorèses simples aussitôt après l'électrophorèse, que dans des AIE lavées et séchées. Chaque expérience comportait une série de plaques d'électrophorèses simples et d'AIE, effectuées simultanément puis soumises à des réactions de caractérisation différentes que nous pouvions ensuite juxtaposer. Des inhibiteurs ont été utilisés pour distinguer les cholinestérases des ali-estérases : esérine à des concentrations de 10^{-4} à 10^{-8} M, et DFP (diisopropyl-fluorophosphate) de 10^{-3} à 10^{-8} M.

Uriel [24, p. 54] propose également une technique que nous avons appliquée pour la révélation d'une protéase. Nous avons utilisé comme substrat l'hémoglobine dénaturée par l'acide chlorhydrique (Hb-HCl), ou par l'urée, et dans quelques cas la caséine, en solution à 0,2 p. 100 finale tamponnée à divers pH. Des essais d'inhibition de la protéase ont été faits avec le DFP.

RÉSULTATS.

1° *Avec l'hémolysat entier Hem/ss.* — Dans l'électrophorèse simple colorée au noir amide (pl., fig. 1 A), la tache due à l'hémoglobine prédomine. Avant toute coloration, le pigment s'étire légèrement vers la cathode. Le noir amide révèle une fraction plus « lente », spontanément incolore, qui prolonge l'aire de l'hémoglobine. Plus près encore de la cathode, on voit une petite tache plus ou moins nettement isolée. A l'opposé, le noir amide fait apparaître vers l'anode un prolongement comme une sorte de manche de raquette, sur lequel on voit se détacher deux fractions, de mobilité correspondant à l'albumine sérique pour l'une, aux α_1 -globulines pour l'autre. La coloration des estérases par l'acétate de β -naphthyle fait apparaître en rouge-violet, dans l'ordre des mobilités décroissantes (pl., fig. 1 C), une petite fraction de mobilité correspondant aux protéines rho sériques, et même plus

« rapide ». On pourait appeler cette fraction ϵ_1 (epsilon = estérase). On ne l'observe qu'avec des préparations d'hémolysat fraîches, elle perd son activité en deux mois environ de conservation à $+4^\circ$. On aperçoit souvent derrière cette fraction une traînée très discrète d'activité estérasique, jusqu'à une tache importante, la plus intense des fractions mobiles (ϵ_2) dont la mobilité correspond aux α_1 -globulines sériques. Puis on trouve une coloration intense du réservoir de départ si l'on a travaillé avec un hémolysat contenant encore des stromas. Du côté de la cathode et juste après l'hémoglobine, on voit une troisième fraction estérase mobile, ϵ_3 , superposable à la première fraction non-hème colorable au noir amide. Enfin une quatrième fraction, ϵ_4 , dont la coloration est souvent très discrète et qui se trouve également à la hauteur d'une protéine colorée au noir amide.

La technique à l'acétylthiocholine décrite par Uriel [24] ne nous a donné aucune coloration. La technique de Koelle-Coërs modifiée par Gerebtzoff [10] colore entièrement en jaune le fond de gélose, tandis que le réservoir de départ est brunâtre. La technique de Crevier et Bélanger [5] colore en brun noir le réservoir de départ, mais aucune fraction mobile n'apparaît par ce moyen.

L'usage des inhibiteurs nous a donné les résultats suivants : l'ésérine 10^{-6} M inhibe légèrement l'activité estérasique du réservoir de départ. A 10^{-5} M cette activité est fortement inhibée, elle disparaît à 10^{-4} M. Ce n'est qu'à cette concentration forte que l'activité des fractions mobiles fléchit. Le DFP à 10^{-7} M semble inhiber déjà l'activité estérasique des stromas contenus dans le réservoir de départ. A 10^{-4} M DFP, l'activité du réservoir est nulle tandis que les fractions mobiles ne sont pratiquement pas inhibées.

L'AIE nous a donné ces derniers temps de nouvelles lignes (pl., fig. 1 D) avec l'hémolysat entier et avec les extraits concentrés. Certaines lignes (*f*) n'apparaissent bien qu'avec des concentrations faibles d'antigènes (hémolysat 1/8), tandis que d'autres (*v*, *x*) n'apparaissent qu'avec de fortes concentrations, mais une diffusion brève (sept heures). Parmi les traits de précipitation révélés à l'AIE, la ligne *e* est à la hauteur de la fraction estérasique ϵ_3 , la ligne *f* à la hauteur de ϵ_4 . La ligne *x* est à la hauteur de ϵ_2 et la ligne *u* de la fraction ϵ_1 . Aucune de ces lignes ne montre d'activité estérasique propre par la technique utilisant l'acétate de β -naphthyle. Seule la ligne de l'hémoglobine montre parfois une légère activité que nous avons pu attribuer à une imprégnation par les estérases de l'immunsérum de lapin.

2° *Extrait butylique*. — L'extrait butylique préparé à partir d'une suspension de stromas lavés ne nous donne que très peu d'activité estérase : coloré à l'acétate de β -naphthyle après électro-

phorèse simple, il semble ne contenir que la fraction ϵ_3 . Il n'y a pas de coloration du réservoir de départ, puisque l'extrait ne contient plus de stromas. L'examen de cet extrait ne révèle aucune fraction colorable par l'acétylthiocholine selon Uriel et donc identifiable à l'AChE. La technique de Koelle-Coërs ne donne rien, ni celle de Crevier et Bélanger.

Avec le noir amide, on colore en tout cas deux fractions « non-hème » révélées aussi dans l'hémolysat total, du côté de la cathode.

L'AIE fait apparaître, à partir de l'extrait butylique concentré, des lignes nouvelles. Il y a une ligne dont la mobilité correspond à celle des fractions rho du sérum. Elle semble due à l'estérase ϵ_1 , mais nous ne lui trouvons pas, en tant qu'immun-précipité, d'activité estérasique. Cette ligne n'apparaît qu'avec un de nos immunosérums concentré trois fois. De même, à la hauteur de l'estérase ϵ_2 , nous trouvons avec un immunosérum concentré, une ligne de précipitation qui est faible et ne nous a pas montré jusqu'à maintenant d'activité estérasique.

La fraction estérase ϵ_3 se retrouve au niveau de la ligne *e* du schéma général immuno-électrophorétique. Mais cette ligne ne se colore pas, pas plus que la ligne *f*, qui est à la hauteur de la fraction ϵ_4 et qui n'apparaît que dans des conditions mentionnées ci-dessus à propos des hémolysats totaux.

L'extrait butylique de stromas contient une protéase, qui se situe, après électrophorèse simple en gélose, du côté de l'anode. C'est une fraction légèrement plus « rapide » que l'estérase ϵ_2 (pl., fig. 2). C'est à l'égard de l'hémoglobine dénaturée par HCl (Hb-HCl) que son activité se manifeste le plus nettement. L'Hb dénaturée a été utilisée également aux pH compris entre 6,4 et 7,4, mais ce substrat est relativement moins attaqué que Hb-HCl. La caséine semble être assez peu attaquée par la protéase. Nous avons trouvé pour cette enzyme un optimum d'activité à pH 3-3,5. Mais l'investigation, aux pH supérieurs de la gamme utilisée, est rendue plus difficile du fait que le substrat, peu soluble dans les milieux proches de la neutralité, imprègne mal la gélose pendant l'incubation et par conséquent l'activité de la protéase est plus difficile à juger. Nous n'avons pas trouvé de sensibilité appréciable de la protéase au DFP entre les concentrations de 10^{-3} et 10^{-8} M, avec ces substrats et dans nos conditions d'expérience.

L'analyse immuno-électrophorétique de l'extrait butylique de stromas fait apparaître, à la hauteur de la protéase, un trait de précipitation très fin que nous avons désigné par la lettre *v*.

3° *Extraction par alcool-chloroforme*. — Cet extrait est à première vue dépourvu d'hémoglobine. Par contre, il est fortement

enrichi en ce qui concerne les deux fractions lentes non-hème, comme le montre la coloration au noir amide (pl., fig. 1 B). Du côté de l'anode, on colore par le noir amide une traînée protéique très faible. La coloration des estérases par l'acétate de β -naphthyle fait apparaître la fraction ϵ_2 ainsi que les deux fractions « lentes » ϵ_3 et ϵ_4 . Nous ne retrouvons pas la fraction ϵ_1 , et le réservoir de départ, dépourvu de stromas, n'est pas coloré non plus. L'AIE de cet extrait fait apparaître avant tout la ligne e , qui, là non plus, n'a pas d'activité estérasique. On y trouve aussi la catalase assez concentrée. Il y a dans certaines préparations une ligne dont la mobilité correspond à celle de l'hémoglobine, et qui s'est révélée être effectivement l'Hb. Il reste donc parfois des traces de cet antigène, révélées par l'AIE.

DISCUSSION.

Nous trouvons dans l'hémolysat soluble quatre fractions estérasiques de mobilité électrophorétique distincte, auxquelles on peut ajouter une activité très intense située dans les stromas et ne sortant donc pas du réservoir de départ. Les stromas contiennent-ils ces mêmes quatre fractions, ou encore d'autres ? Ils contiennent certainement l'AChE comme l'indiquent plusieurs auteurs [15, 26, 27] ; mais nous n'avons pu l'en extraire, en suivant leurs indications techniques, ou du moins nous n'avons pas réussi jusqu'à maintenant à la révéler, notamment dans un extrait butylique de stromas où ces auteurs l'ont trouvée. Par contre, l'effet inhibiteur de l'ésérine et du DFP sur l'activité estérasique du réservoir de départ quand il contient des stromas, se fait sentir à des taux qui nous permettent de penser que c'est bien dans le réservoir et là seulement (dans nos conditions d'expérience) que se trouve l'AChE. Les techniques de Gerebtzoff et de Crevier et Bélanger confirment cette impression.

Des quatre fractions estérasiques présentes dans la portion soluble de l'hémolysat, aucune n'est colorable par les techniques à l'acétylthiocholine, et aucune ne paraît particulièrement sensible à l'ésérine ou au DFP. Aucune de ces quatre fractions ne semble donc être l'AChE, contrairement à ce que nous pensions trouver [47]. Elles seraient toutes les quatre des aliéstérases (sans plus de précision). Des études ultérieures devraient permettre de rechercher plus nettement la spécificité de chacune d'elles. La fraction la plus « rapide » en électrophorèse, ϵ_1 , paraît avoir une activité estérasique assez labile : on ne la révèle bien que dans les hémolysats préparés relativement récemment. Et cependant, dans les hémolysats conservés plus de deux mois + 4° C, ou dans un extrait butylique concentré, alors que l'activité de ϵ_1 a disparu, il y a encore à ce niveau un antigène précipi-

tant avec l'immunsérum de lapin en AIE, ce qui indique que l'activité enzymatique de la molécule est plus fragile que son pouvoir de précipiter avec l'anticorps.

La fraction ϵ_2 est la plus active, avec l'acétate de β -naphtyle, d'autant plus que la concentration en protéine à ce niveau, après coloration par le noir amide, est relativement beaucoup plus faible qu'au niveau des fractions ϵ_3 et ϵ_4 . Le cas de ces deux dernières fractions est intéressant, mais non entièrement résolu. Nous avons vu qu'il était possible de les concentrer dans l'extrait par alcool éthylique + chloroforme ; elles conservent alors leur activité estérasique, mais à un taux plus faible que celui auquel nous nous attendions. Il est possible que la dénaturation par l'alcool et le chloroforme, qui touche si nettement l'Hb, altère aussi un peu ces deux estérases. Il est possible aussi que chacune de ces fractions comporte encore d'autres molécules de même mobilité électrophorétique. Cela ne peut être exclu bien que chacune de ces fractions paraisse électrophorétiquement homogène, et bien que l'AIE ne révèle qu'un trait de précipitation au niveau de l'une et de l'autre. Inversement, s'il a été impossible de révéler une activité estérasique au niveau des immunprécipités *e* et *f* qui se trouvent respectivement de mobilité exactement correspondante aux estérases ϵ_3 et ϵ_4 , il est bien possible que ces enzymes soient inhibées par les anticorps de lapin. Chacune des estérases solubles de l'hémolysat se trouve ainsi au niveau d'un des traits de précipitation du schéma immuno-électrophorétique. Mais aucune de ces lignes n'a manifesté d'activité estérasique dans nos conditions d'expérience. Cela s'oppose aux résultats d'Uriel [24], qui a montré que les immunprécipités des estérases du sérum humain conservaient leur activité enzymatique. Les anticorps de lapin semblent donc avoir sur l'enzyme un effet inhibiteur que n'ont pas les anticorps de cheval. Holland [45] a fait des observations intéressantes avec des immunsérums de lapin préparés contre une cholinestérase purifiée d'hématies de bœuf : les immunsérums à l'état frais avaient envers la cholinestérase un pouvoir inhibiteur dans lequel le complément semble jouer un rôle. Nous ne pouvons confirmer ce rôle du complément qui, dans nos expériences, ne semble pas en cause.

Pourquoi avons-nous pu révéler dans l'hémolysat normal 4 estérases, qui semblent distinctes de l'ACHé présente seulement dans le stroma érythrocytaire, alors que Richter et coll. [20], puis Glasson [12, 13], avaient établi l'existence dans le globule rouge humain d'une aliestérase à côté de l'ACHé ? Davies et coll. [6] ont montré qu'une ChE « non spécifique » se trouve dans les hématies de rat, mais celles de l'homme sont réputées ne contenir que l'ACHé [25, 3]. Si nous trouvons des estérases si nombreuses, c'est probablement parce que nous avons dissocié par électro-

phorèse ces constituants de l'hémolysat où ils se trouvent apparemment en proportion trop faible pour être distingués par les seules méthodes enzymologiques. La présence en très faible quantité de ces fractions dans les hémolysats n'empêche pas, si elles sont de bons antigènes, qu'elles suscitent l'apparition d'anticorps précipitants appréciables dans le sérum des lapins immunisés.

Les travaux de Derrien et coll. [7, 8, 9] font état de différentes fractions d'hémoglobine dans les hématies humaines adultes normales. Nous avons indiqué dans un précédent travail [21] les résultats que nous avons obtenus au sujet de l'Hb, en particulier au moyen de l'analyse immuno-électrophorétique, montrant qu'il existait une réaction d'identité partielle immunologique entre deux fractions hémoglobiniques, Hb et Hb'. Boivin et coll. [4] ont obtenu des résultats semblables. Nous avons aussi noté une certaine correspondance avec les images que Derrien et coll. avaient obtenues en électrophorèse sur papier ou en gélose. Ces auteurs ont signalé en 1956 la présence d'une protéine X accompagnant l'Hb dans leurs préparations. Allen et coll. [1] ont ajouté qu'il s'agissait d'une « non-hème protéine ». Derrien et coll. [8] ont ensuite mis en évidence, en plus de X_1 , trois autres « non-hème protéines », X_2 , Y et Z. De leur côté, Giri et coll. [11] ont observé après électrophorèse en gélose à pH 8,6, trois protéines au-delà de l'Hb du côté cathode, qu'ils ont appelées dans l'ordre des mobilités décroissantes : RP_1 , RP_2 et RP_3 . Ces trois fractions, en raison de leur position électrophorétique et de leurs proportions, semblent correspondre respectivement aux fractions X_1 , Y et Z de Derrien et coll. Nous nous proposons de reprendre les fractions de ces auteurs et de les soumettre aux critères de notre étude. En attendant nous ne pouvons que comparer nos images respectives. Il nous semble que X_1 de Derrien correspond à notre estérase ϵ_3 et à l'immunprécipité e de l'AIE : en effet,

LEGENDE DE LA PLANCHE

FIG. 1. — A : Hémolysat après électrophorèse en gélose à pH 8,2, coloration noir amide ; B : Electrophorèse, dans les mêmes conditions, de l'extrait par alcool + chloroforme ; C : Coloration des estérases (acétate de β -naphtyle) de l'hémolysat total après électrophorèse ; D : AIE de l'hémolysat Hem/ss ; E : Diagramme comparatif de l'AIE du sérum humain normal.

FIG. 2. — A : Les estérases carboxyliques dans l'hémolysat Hem/ss après électrophorèse simple en gélose pH 8,2. Incubation en présence d'acétate de β -naphtyle ; B : La protéase (P) révélée après électrophorèse simple d'un extrait butylique de stromas. Incubation à pH 3 en présence d'Hb HCl.

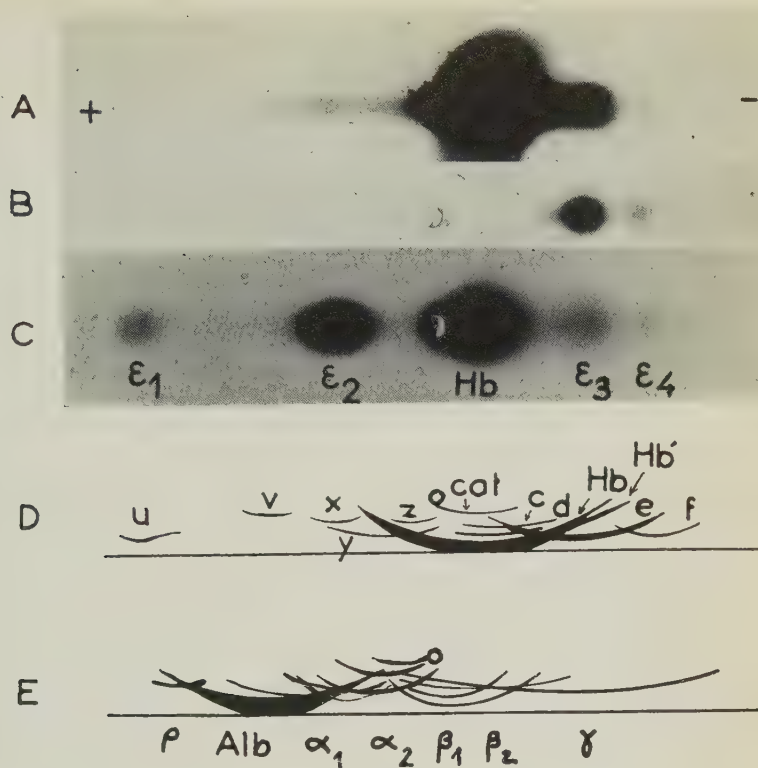


FIG. 1.

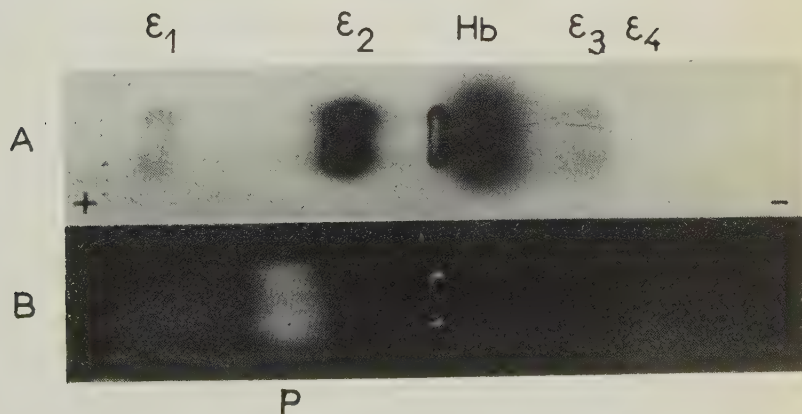


FIG. 2.

c'est l'antigène qui est quantitativement le plus important après l'hémoglobine, et nous avons constaté qu'il accompagne l'Hb dans les essais de cristallisation de celle-ci. La fraction Y correspondrait à notre estérase ϵ_4 et à l'immunprécipité f de l'AIE. Nous ne pouvons dire à quoi correspond la fraction X_2 de Derrien, peut-être à l'antigène donnant la ligne d de notre schéma immuno-électrophorétique. Quant à la fraction Z, son identité est des plus mystérieuses. La catalase se situe, dans nos conditions d'expérience, à la hauteur du réservoir de départ ou légèrement entraînée vers la cathode, soit sensiblement de même mobilité électrophorétique que l'Hb [16].

Derrien et coll, ne mentionnent pas les fractions qui se situent du côté de l'anode (et que l'on soupçonne pourtant sur leurs images électrophorétiques) et qui sont en somme aussi des « non-hème protéines ». Nous avons montré ici que deux de ces fractions sont des estérases.

Nous avons recherché la protéase dans les hémolysats fraîchement préparés, dans les hémolysats conservés environ deux mois à $+4^\circ\text{C}$, dans l'extrait butylique de stromas, et dans l'extrait d'hémolysat par alcool + chloroforme. L'alcool butylique a permis d'extraire des stromas une protéase, alors qu'il n'avait pas permis d'isoler l'ACHÉ. L'origine stromatique de cette protéase ne paraît pas douteuse, il est impossible de la mettre en évidence dans l'hémolysat Hem/ss. Les précautions de lavage des hématies nous semblent suffisantes pour que l'on puisse exclure l'origine leucocytaire de cette enzyme. Le sérum humain, d'autre part, n'a pas d'activité protéolytique directement décelable.

Un hémolysat conservé en présence de ses stromas est doué après quelque temps d'une très légère activité protéolytique de même localisation électrophorétique que celle de l'extrait butylique : encore une preuve de l'origine stromatique de la protéase, car il est connu qu'avec le temps les complexes lipoprotidiques, importants pour la structure du stroma, se dissocient. La conservation même à froid aurait donc en quelque sorte le même effet lytique sur le stroma que l'alcool butylique par exemple.

Morrison et Neurath [18] ont distingué trois types de protéases érythrocytaires, situées dans le stroma, en combinant divers critères : 1° mode d'extraction ; 2° pH optimum d'activité ; 3° agents activateurs (ions etc.). S'agit-il de trois molécules différentes ?

Nous n'avons pu, pour l'instant, établir avec précision une courbe d'activité en fonction du pH. Cette mesure est subordonnée à la relativité de l'imbibition du gel par la protéine-substrat, qu'il est difficile d'obtenir de façon uniforme aux différents pH. Cependant, l'optimum nous paraît se situer autour de pH 3.

Contrairement à d'autres protéases, celle-ci ne paraît pas inhibée par le DFP, sinon peut-être, de façon douteuse, à une concentration de 10^{-3} M DFP.

Les activités estérase et protéase sont souvent associées (*Cf* les préparations commerciales de trypsine par exemple). Dans le globule rouge, si ces deux activités sont portées par des molécules voisines, elles sont pourtant distinctes, puisqu'elles n'ont pas la même mobilité électrophorétique, et puisque l'une se trouve dans le stroma globulaire tandis que l'autre n'a été révélée que dans l'hémolysat soluble.

Ajoutons à ce propos que nous appelons « hémolysat soluble » la partie d'emblée soluble (soit ce qui n'est pas le stroma) lors de la préparation des hémolysats. Mais il est bien évident que cette définition est imparfaite puisqu'on solubilise par la suite (au moyen de l'alcool butylique par exemple) certains constituants du stroma.

Lors de l'AIE, nous constatons la présence d'un trait de précipitation de même mobilité électrophorétique que la fraction protéase. Mais là, pas plus que pour les estérases, nous ne savons s'il s'agit bien de l'immunprécipité de la protéase. Notre technique ne permet peut-être pas de le dire, puisqu'elle colore en bleu indifféremment tout ce qui est protéique, immunprécipité et substrat. La présence dans nos immunsérums d'un anticorps dirigé contre un constituant du stroma ne nous surprend pas, puisque les lapins en immunisation ont reçu des hémolysats comportant des stromas.

On peut se demander quel est le rôle de cette protéase dans le stroma érythrocytaire. Est-ce un vestige de l'activité biochimique des précurseurs de l'hématie ? Joue-t-elle un rôle au contraire à la fin de la vie globulaire ? Il est possible que cette protéase intervienne dans certains types d'hémolyse.

RÉSUMÉ.

1° L'analyse immuno-électrophorétique nous a permis de distinguer jusqu'à maintenant 12 antigènes dans l'hémolysat, dont 2 seulement correspondent à des fractions hémoglobiniques. Un troisième est la catalase. Quatre autres, bien que n'ayant pas d'activité enzymatique décelable en AIE, sont probablement des aliestérases, ou ont du moins un comportement électrophorétique en gélose exactement superposable à celui de quatre fractions estérases que nous avons révélées dans l'hémolysat humain normal. Les techniques enzymatiques ont permis de retrouver l'AcHe dans les stromas érythrocytaires. Par contre, aucune des fractions solubles ne semble être l'AcHe.

2° Une protéase a été extraite du stroma érythrocytaire au moyen de l'alcool butylique. Son activité a été mise en évidence par incubation en présence d'Hb dénaturée par l'acide chlorhydrique. La mobilité électrophorétique de cette fraction la situe dans la zone correspondant à l'albumine sérique. L'AIE révèle un trait de précipitation au niveau de la protéase, mais il n'est pas certain que celle-ci en soit l'antigène.

SUMMARY.

IMMUNOCHEMICAL STUDIES ON THE HEMOLYSATES OF HUMAN RED BLOOD CELLS.

IV. — THE CARBOXYLIC ESTERASES AND A PROTEASE.

1° Immuno-electrophoretic analysis allows to demonstrate in these hemolysates the presence of 12 antigens, only 2 of which corresponding to hemoglobinic fractions. Catalase constitutes a third antigen. Four other antigens, although possessing no enzymic activity demonstrable by immuno-electrophoresis, seem to be aliesterases, at any rate they have in gel an electrophoretic compartment identical with that of four esterase fractions demonstrated in normal human hemolysates. Enzymic techniques allowed to demonstrate AChE in red cells stromas. On the other hand, no soluble fraction seems to be AChE.

2° A protease was extracted from red cell stromas by means of butylic alcohol. Its activity was demonstrated by incubation in presence of Hb denatured by HCl. Electrophoretic study of this fraction shows its localization in the area corresponding to serumalbumin. Immuno-electrophoretic analysis shows a line of precipitation at the level of this protease, which however cannot be considered with certainty as the responsible antigen.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] ALLEN (D. W.), SCHROEDER (W. A.) et BALOG (J.). *J. amer. chem. Soc.*, 1958, **80**, 1628.
- [2] ARVY (L.). *Biol. Med.*, 1958, **47**, 12.
- [3] AUGUSTINSSON (K. B.). *Acta physiol. scand.*, 1948, **15**, suppl. 52.
- [4] BOIVIN (P.), HARTMANN (L.) et FAUVERT (R.). *Rev. fr. Et. clin. biol.*, 1959, **4**, 799.
- [5] CREVIER (M.) et BELANGER (L. F.). *Science*, 1955, **122**, 556.
- [6] DAVIES (D. R.) et RUTLAND (J. P.). *Nature*, 1956, **178**, 697.
- [7] DERRIEN (Y.), LAURENT (G.) et BORGOMANO (M.). *C. R. Acad. Sci.*, 1956, **242**, 1538.
- [8] DERRIEN (Y.), LAURENT (G.) et REYNAUD (J.). *C. R. Soc. Biol.*, 1958, **152**, 971.

- [9] DERRIEN (Y.), LAURENT (G.), DEPIEDS (R.) et BORGOMANO (M.). *C. R. Soc. Biol.*, 1959, **153**, 638.
- [10] GEREBTZOFF (M. A.). *Cholinesterases in International series of monographs on pure and applied biology*, Pergamon Press, Londres 1959.
- [11] GIRI (K. V.) et NATARAJAN (S.). *Nature*, 1958, **182**, 184.
- [12] GLASSON (B.). *Pharm. Acta Helv.*, 1944, **19**, 279.
- [13] GLASSON (B.). *Schw. med. Wschr.*, 1945, **75**, 1011.
- [14] GRABAR (P.) et WILLIAMS (C. A. Jr.). *Biochem. Biophys. Acta*, 1953, **10**, 193 et 1955, **17**, 67.
- [15] HOLLAND (W. C.). *Brit. J. exp. Path.*, 1953, **25**, 205.
- [16] MICHELI (A.), PEETOOM (F.), ROSE (N.), RUDDY (S.) et GRABAR (P.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1960, **98**, 694.
- [17] MICHELI (A.) et GRABAR (P.). *Proc. Colloq. prot. biol. fluids*, Bruges, 1960.
- [18] MORRISON (W. L.) et NEURATH (H.). *J. biol. Chem.*, 1953, **200**, 39.
- [19] PEETOOM (F.), ROSE (N.), RUDDY (S.), MICHELI (A.) et GRABAR (P.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1960, **98**, 252.
- [20] RICHTER (D.) et CROFT (P. G.). *Biochem. J.*, 1942, **36**, 746.
- [21] ROSE (N.), PEETOOM (F.), RUDDY (S.), MICHELI (A.) et GRABAR (P.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1960, **98**, 70.
- [22] SCHEIDEGGER (J. J.). *Internat. Arch. Allergy*, 1955, **7**, 103.
- [23] TSUCHIHASHI. *Biochem. Z.*, 1923, **140**, 63.
- [24] URIEL (J.), in GRABAR (P.) et BURTIN (P.). *L'analyse immuno-électrophorétique, ses applications aux milieux biologiques humains*, Masson et C^{ie}, édit., Paris, 1960.
- [25] ZELLER (E. A.) et BISSEGER (A.). *Helv. chim. Acta*, 1943, **26**, 1619.
- [26] ZITTLE (C. A.), DELLA MONICA (E. S.) et CUSTER (J.). *Arch. Biochem. Biophys.*, 1954, **48**, 43.
- [27] ZITTLE (C. A.), DELLA MONICA (E. S.), CUSTER (J.), et KRIKORIAN (R.). *Arch. Biochem. Biophys.*, 1955, **56**, 469.
-

ACTION BACTÉRICIDE DU YAOURT SUR LES MYCOBACTÉRIES

par A. TACQUET, F. TISON et B. DEVULDER (*).

(Institut Pasteur de Lille)

L'action bactéricide des yogourts sur les Mycobactéries a fait l'objet des travaux de Guisel [5, 6] et de Golem [4] en Turquie. Dormer et coll. [1], en Afrique du Sud, ont montré également que le « calabash milk » (lait fermenté enalebasse) possédait une activité analogue, quoique moins rapide.

Nous avons recherché dans ce travail si les yaourts de fabrication française possèdent également cette action et nous avons tenté d'en préciser le mécanisme.

1° EFFET BACTÉRICIDE DU YAOURT.

Cette étude a été réalisée à l'aide de :

a) *Mycobacterium tuberculosis* de type humain (trois souches récemment isolées de crachats, sensibles aux substances antibacillaires, et H37Rv) ;

b) Une souche BCG (847 de l'Institut Pasteur) ;

c) Une souche aviaire récemment isolée d'une poule tuberculeuse ;

d) Deux souches de Mycobactéries atypiques photochromogènes (souches R et Y) ;

e) Une souche de Mycobactérie atypique à croissance rapide (souche Grassberger).

Des concentrations de 10^{-1} à 10^{-4} de ces germes ont été mises en suspension dans 10 ml de yaourt et laissées à la température du laboratoire pendant des délais de un à six jours. Des prélèvements ont été effectués au temps zéro, puis une, trois, dix-huit, vingt-quatre, quarante-huit, soixante-douze heures, etc., après le début de l'expérience, et ensemençés, à raison de 0,10 ml par tube, sur milieux de Löwenstein-Jensen.

(*) Société Française de Microbiologie séance du 10 janvier 1961.

Cette expérimentation a été réalisée selon deux modalités :

1° *Soit sur yaourt frais* ; les prélèvements ont alors été traités par les détergents (Teepol-soude à 1 p. 100) avant ensemencement.

2° *Soit sur yaourt stérilisé par autoclavage à 110° pendant vingt minutes*, afin d'éviter l'emploi d'un agent d'épuration. Sous l'action de la chaleur, il se produit une coagulation du yaourt et seul le liquide surnageant est utilisé. Les prélèvements ont été lavés une fois à l'eau distillée, avant l'ensemencement sur milieux spéciaux.

Dans les deux cas, les résultats que nous avons obtenus ont été identiques.

Le tableau I permet de comparer les délais de survie des diffé-

TABLEAU I. — Délais de survie dans le yaourt de différents types de *Mycobactéries*.

SOUCHES	TEMPS DE CONTACT EN HEURES						
	0	1	3	18	24	48	72
Myc. tuberculosis type humain (4 souches)							
B.C.G. 847							
Myc. avium (poule)							
Myc. atypique photochromogène (R. et Y.)							
Myc. atypique à croissance rapide (Grassberger)							

rents types de *Mycobactéries* mises en suspension à la concentration de 10^{-1} dans le yaourt, préalablement autoclavé. La hauteur des colonnes de ce tableau est fonction de l'importance de la culture des *Mycobactéries*.

L'action bactéricide du yaourt est particulièrement nette pour les *Mycobactéries* humaines, bovines et BCG, qui ne cultivent plus après des temps de contact respectifs de dix-huit à vingt-quatre

heures. Les Mycobactéries aviaires et les Mycobactéries atypiques photochromogènes et à croissance rapide restent vivantes après six jours de contact avec le yaourt. Cette activité a été constamment observée avec de nombreux yaourts provenant de trois marques différentes et n'a pas disparu après autoclavage, ce qui permet d'éliminer le rôle des germes fermentants (*Streptococcus*, *Lactobacillus*). Cette constatation nous a donc amenés à envisager l'influence d'autres facteurs susceptibles d'expliquer ce pouvoir bactéricide.

2° POUVOIR BACTÉRICIDE DES ÉLÉMENTS CONSTITUTIFS DU YAOURT.

a) *Le lait* ne possède pas, dans nos conditions expérimentales, cette activité anti-bactérienne, ainsi que le montre la lecture du tableau III. Il contient cependant certains facteurs doués d'activité antibiotique [2, 3, 7].

b) *La nizine* est-elle responsable de cette action ?

Cette étude a été réalisée avec différentes souches de Mycobactéries typiques (H37Rv, Ravenel, aviaire) ou atypiques (photochromogènes et à croissance rapide), ensemencées sur milieux de Löwenstein-Jensen, imprégnés en surface avec une solution de nizine aux concentrations de 1, 5, 10, 100 μg par centimètre carré de milieu.

Aucune inhibition n'a été observée, pour ces différentes souches de Mycobactéries, avec cet antibiotique contenu fréquemment dans les laits acidifiés.

c) *Le pH*. Yogourts et laits de calesbasse ont un pH acide : il était en moyenne de 4,25 pour nos yaourts. La mesure de l'acidité totale nous a donné un chiffre moyen de 0,046 molécule par litre dont 0,024 M pouvait être neutralisé par une base. Les acides fixes ont une valeur de 0,04025 molécule par litre ; les acides volatiles de 0,00575 molécule par litre. Qualitativement, l'acidité volatile est due à l'acide acétique et à des traces d'acidé butyrique ; l'acidité fixe est due à l'acide lactique droit (1).

Afin de préciser le rôle du pH, nous avons étudié la survie de deux souches de *Mycobacterium tuberculosis*, l'une de type humain, l'autre de type bovin, et d'une souche de Mycobactérie atypique photochromogène, mises en suspension, à la dilution de 10^{-1} dans 10 ml des solutions stériles suivantes :

- 1° Solution à pH 4,2 d'acide chlorhydrique dans l'eau distillée,
- 2° Liquide surnageant, neutralisé, de yaourt (autoclavé),
- 3° Eau distillée (solution témoin).

(1) Etudes effectuées dans le Laboratoire de Chimie bactérienne par M. Guillaume.

Nous avons constaté que, dans nos conditions expérimentales :

La solution acide à pH 4,2 ne possède pas d'activité bactéricide, même après un temps de contact de six jours ;

Cette activité du yaourt disparaît après neutralisation du produit.

d) *L'acide lactique*. — L'un des constituants essentiels du yaourt étant l'acide lactique droit, nous avons recherché si l'activité du produit était due à l'ion lactate ou à l'acide lui-même.

TABLEAU II. — Délais de survie de différents types de *Mycobactéries* dans des solutions d'acide lactique à 0,36 p. 100 (solution A) et à 0,72 p. 100 (solution B) ; pH 4,2.

SOUCHES	SOLUTION	TEMPS DE CONTACT EN HEURES					
		0	3	18	24	48	72
Myc. tuberculosis type humain (H ₃₇ Rv)	A	■	■	■	■	■	■
	B	■	■	■	■	■	■
B.C.G. 847	A	■	■	■	■	■	■
	B	■	■	■	■	■	■
Myc. avium (poule)	A	■	■	■	■	■	■
	B	■	■	■	■	■	■
Myc. atypiques photochromogènes (R. et Y.)	A	■	■	■	■	■	■
	B	■	■	■	■	■	■
Myc. atypique à croissance rapide (Grassberger)	A	■	■	■	■	■	■
	B	■	■	■	■	■	■

L'ion lactate ne montre aucune action sur les *Mycobactéries* typiques ou atypiques, ainsi que nous avons pu le vérifier à l'aide d'acide lactique utilisé à une concentration égale à celle contenue dans le yaourt, mis en solution dans l'eau distillée et neutralisé par la soude.

L'acide lactique possède cette activité sous certaines conditions.

Nous avons constaté, en effet, qu'une solution de cet acide en eau distillée, à une concentration permettant d'obtenir un pH de 4,2 ne modifie en aucune façon la vitalité des Mycobactéries. Dormer et coll. [4] avaient fait des constatations analogues et pensaient que l'acide lactique n'était pas responsable de l'activité anti-bactérienne des laits acidifiés. En réalité, la quantité d'acide nécessaire pour obtenir une solution d'acide lactique de pH 4,2 est très faible ; elle est assurément différente des concentrations ioniques présentes dans le yaourt, à la fois sous forme d'acide et surtout sous forme de lactate.

Il y avait donc lieu de penser que le pH, seul, de l'acide lactique n'était pas suffisant pour expliquer cette activité, d'autant

TABLEAU III. — Délais de survie de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv dans le lait, le yaourt et l'acide lactique.

PRODUITS ETUDIÉS	TEMPS DE CONTACT					
	0 heure	18 heures	24 heures	48 heures	72 heures	6 jours
LAIT ENTIER						
YAOURT pH 4,2						
YAOURT NEUTRALISÉ						
ACIDE LACTIQUE A 0,72 % pH 4,2						
ACIDE LACTIQUE A 0,72 % NEUTRALISÉ						

plus que l'acide racémique ne contient que 50 p. 100 du produit rotatoire droit, constituant essentiel du yaourt.

Nous avons donc étudié l'influence sur les divers types de Mycobactéries de solutions fortement concentrées en ions lactiques, à la fois sous forme de lactate et d'acide, à pH 4,2.

Cette expérience a été réalisée à l'aide de différents types de Mycobactéries, mis en suspension (à la concentration de 10^{-1}) dans 10 ml des solutions, stérilisées par filtration, contenant :

Solution A : 0,36 p. 100 d'acide lactique racémique.

Solution B : 0,72 p. 100 d'acide lactique racémique (soit 0,36 p. 100 d'acide gauche et 0,36 p. 100 d'acide droit).

La très forte acidité de ces deux solutions a été corrigée par la soude jusqu'à un pH de 4,2.

Les résultats de cette expérience (tableau II) montrent que l'acide lactique, utilisé à pH 4,2 et de façon telle que son isomère droit soit à une concentration finale égale à celle du yaourt, possède une activité bactéricide très rapide, vis-à-vis des *Mycobacterium tuberculosis* de type humain et bovin, en tous points comparable à celle du produit alimentaire naturel.

Le tableau III résume les résultats d'une étude des activités bactéricides du lait entier, du yaourt à pH 4,2, du yaourt neutralisé, de l'acide lactique (à la concentration de 0,72 p. 100, à pH 4,2 ou neutralisé) sur la souche humaine H37Rv.

RÉSUMÉ.

Le yaourt possède en dix-huit à vingt-quatre heures une activité bactéricide pour les Mycobactéries humaines, bovines et BCG. Les Mycobactéries aviaires et atypiques restent vivantes après six jours de contact.

Cette activité n'est pas due à la nizine ; elle disparaît après neutralisation du yaourt ; toutefois, elle n'est pas liée uniquement à l'acidité du produit ; l'acide lactique possède dans certaines conditions (pH 4,2 et à concentration finale de l'isomère droit égale à celle du yaourt) la même action bactéricide.

SUMMARY

BACTERICIDAL ACTIVITY OF YAOURT AGAINST MYCOBACTERIA.

Suspensions of human, bovine and BCG Mycobacteria placed in yaourt are killed in 18 to 24 hours. Avian and atypic Mycobacteria are still living after 6 days contact.

This activity is not due to nyzin ; it disappears after neutralization of yaourt. However, it does not depend on the acidity only. Under certain conditions (pH 4.2 and with a final concentration of the dextrogyre isomer as high as that of yaourt), lactic acid possesses the same bactericidal activity.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] DORMER (B. A.), MARTINAGLIA (G.) et BEEMER (A. M.). *South Afr. Med. J.*, 1953, **27**, 1121.
 - [2] FRANC (Z.). *Rozhledy Tub.*, 1959, **19**, 475.
 - [3] FRANC (Z.), HAIS (I. M.) et HORESOVSKY (O.). *Nature*, 1958, **182**, 884.
 - [4] GOLEM (B.). *Hifzissihha Tecrubu Biol. Dergisi*, 1944, **4**.
 - [5] GURSEL (A.). *Turk ijiyen Tecrubu Biol. Dergisi* 1957, **17**, 40.
 - [6] GURSEL (A.) et NURSRET (F.). *Turk ijiyen Tecrubu Biol. Dergisi*, 1953, **12**, 79.
 - [7] SIMEKA (F.), STEDRA (H.) et HAIS (I. M.). *Ceskoslav. Hyg., Epid., Mikrobiol., Immunol.*, 1955, **4**, 124.
-

EFFETS DE L'ALPHA-CHYMOTRYPSINE SUR LE TISSU SOUS-CUTANÉ DU RAT

par Suzanne BAZIN (*), Philippe COMTE (**)
et Albert DELAUNAY (***) (****)

(avec la collaboration technique de Waltraut WOHLFARTH)

(Institut Pasteur, Garches [S.-et-O.]

Le tissu sous-cutané du rat est remarquable par sa richesse en mastocytes. Ces cellules, capables par ailleurs d'élaborer de l'histamine et de la sérotonine, interviendraient dans certains métabolismes, en particulier, selon Asboe-Hansen [1], dans le métabolisme des mucopolysaccharides acides. Récemment enfin, a été révélée, au sein des mêmes éléments, la présence d'enzymes protéolytiques proches de la chymotrypsine (Benditt et Arase [2]) et de la trypsine (Glemer et Cohen [3]). Ce dernier fait conduit à penser que les mastocytes joueraient également un rôle dans le métabolisme de quelques protéines présentes dans la trame conjonctive. Ce rôle, toutefois, reste inconnu. Comme travail d'approche, il nous a paru intéressant d'étudier les effets d'une α -chymotrypsine purifiée sur le tissu sous-cutané du rat. Les résultats obtenus sont brièvement rapportés dans cette note.

PROTOCOLE EXPÉRIMENTAL.

Deux séries d'essais ont été entreprises, l'une *in vitro*, l'autre *in vivo*.

Essais in vitro. Des rats de 125 à 150 grammes reçoivent une injection sous-cutanée, sur la face ventrale, de 10 ml d'eau physiologique. Une heure plus tard, ils sont sacrifiés. Le tissu sous-cutané correspondant à l'injection est prélevé (opération facilitée par l'œdème local), découpé en fins fragments ($\pm 1 \text{ mm}^3$), enfin, malaxé jusqu'à obtention d'une masse homogène. Cela fait, la

(*) Chargée de recherches au C. N. R. S., Institut Pasteur, Garches S.-et-O.).

(**) Ingénieur chimiste.

(***) Chef du Service de Pathologie expérimentale, Institut Pasteur, Garches (S.-et-O.).

(****) Société Française de Microbiologie, séance du 10 janvier 1961.

préparation est divisée en plusieurs parties de poids égal (500 à 800 mg). L'une servira à un dosage de l'eau présente dans le tissu (dessiccation prolongée jusqu'à obtention d'un poids constant). Les autres sont placées dans un incubateur (37°) et soumises à une agitation régulière (dans l'appareil de Warburg) en présence, soit d'un tampon phosphate M/15 de pH 8,2 (pH optimum d'action de l' α -chymotrypsine), soit d'une solution, dans le même tampon, d' α -chymotrypsine (1). Après différents essais, la concentration d'enzyme la plus satisfaisante nous a paru être la suivante : 0,5 mg pour 100 mg de tissu frais. Egalement après plusieurs essais, nous avons retenu comme temps d'incubation optimum : trois heures.

Le temps d'incubation étant révolu, les fragments de tissus étaient séparés du liquide d'incubation par centrifugation, broyés en présence d'un tampon phosphate de pH 7,8 (c'est ce pH que nous utilisons habituellement pour nos extractions de tissu), enfin soumis à trois extractions successives par le même tampon. Finalement, les trois liquides d'extraction étaient réunis au liquide d'incubation et mis à dialyser.

Au cours de la dialyse, un *précipité* ne manquait jamais de se former. Il était recueilli puis lavé trois fois par une solution de ClNa à 10 p. 100, solution qui est capable de dissoudre les euglobulines mais non le collagène neutrosoluble également présent dans le précipité. Le culot du collagène restant, une fois lavé, était mis à dissoudre dans une solution de ClH 6N puis soumis à une hydrolyse à + 105° C d'une durée de vingt-quatre heures. Finalement, la teneur de l'hydrolysate en hydroxyproline était déterminée d'après la technique de Neuman et Logan [4]. Le taux trouvé multiplié par 7,46 représentait la quantité de collagène qui avait appartenu au précipité.

Cependant, les *liquides d'extraction* recueillis après dialyse étaient traités par la méthode de Korn [5] pour l'isolement des mucopolysaccharides acides. Ceux-ci, après trois purifications obtenues par dissolution dans une solution d'acétate de sodium à 10 p. 100 et précipitation par l'alcool, étaient titrés par dosage des acides uroniques, selon la méthode de Dische au carbazol [6].

Quant au résidu fourni par l'extraction au tampon phosphate, il était lavé deux fois à l'eau distillée et mis à macérer pendant quarante-huit heures à + 4° C, dans cinq fois son poids d'un tampon citrate de pH 3,8. Après macération, l'extrait citaté était séparé du culot tissulaire par centrifugation et le collagène dissous était précipité par 10 p. 100 de chlorure de sodium. Le collagène était alors recueilli, dissous dans de l'acide chlorhydri-

(1) Nous avons utilisé une enzyme purifiée mise à notre disposition par la Maison Leurquin. Que celle-ci soit remerciée.

que 6 N, soumis à une hydrolyse de vingt-quatre heures à + 105° C, finalement dosé, comme nous l'avons indiqué ci-dessus, d'après sa teneur en hydroxyproline.

Essais in vivo. Des rats témoins reçoivent une injection de 10 ml d'eau physiologique, par voie sous-cutanée, sur la face ventrale. D'autres rats sont traités, de la même manière, par une solution d' α -chymotrypsine dans l'eau physiologique.

Dose injectée d'enzyme (déterminée après plusieurs essais pré-alables) : 0,5 mg/ml d' α -chymotrypsine ; temps d'action *in situ* : deux heures.

A noter : lorsque l'injection d'enzyme a été faite assez profondément, aucune lésion épidermique n'apparaît. En revanche, quand la même injection a été superficielle, en particulier quand des gouttelettes de liquide se sont répandues à la surface de la peau (éventualité qui n'est pas rare car le liquide injecté a tendance à échapper à la peau tendue), il peut se produire une déchirure (sorte de décollement de l'épiderme) entourée d'une zone rouge suintante. A noter aussi : au moment des prélèvements, le tissu sous-cutané normal est pratiquement incolore et présente l'aspect d'une gelée transparente ; au contraire, le tissu qui a contenu l'enzyme est toujours sanguinolent.

RÉSULTATS

Les résultats de nos dosages se trouvent reproduits dans le tableau I. Les valeurs que nous donnons correspondent aux moyennes de trois dosages effectués sur des mélanges de tissus

TABLEAU I.

	MATIÈRES DISSOUTES DANS LE TAMPON PHOSPHATE		MATIÈRE DISSOUTE DANS LE TAMPON CITRATE
	M. P. acides	Collagène neutrosoluble	Collagène acidosoluble
Essais <i>in vitro</i> :			
Tissus témoins	34	36,6	440
Tissus traités par l' α - chymotrypsine	47,4	47,7	491
Essais <i>in vitro</i> :			
Tissus témoins	34,7	27,5	468
Tissus traités par l' α - chymotrypsine	72,9	54,5	479

sous-cutané provenant de six rats. Il s'agit de milligrammes rapportés à 100 grammes de tissu sec. Les mucopolysaccharides sont exprimés en acide glucuronique.

La lecture de ce tableau montre qu'en ce qui concerne le tissu sous-cutané du rat, *in vitro* et *in vivo*, l' α -chymotrypsine augmente de façon très nette le taux des mucopolysaccharides acides solubles dans un tampon de pH 7,8. L'augmentation constatée est, *in vitro*, de l'ordre de 39 p. 100, *in vivo*, de 110 p. 100.

La lecture du même tableau montre aussi que le taux du collagène neutrosoluble qu'on peut extraire du tissu sous-cutané du rat au moyen d'un tampon de pH 7,8, s'accroît, après action de l'enzyme *in vitro*, de 30 p. 100, après action *in vivo*, de 100 p. 100.

Cependant, l' α -chymotrypsine, utilisée *in vitro* ou *in vivo*, n'arrive pas à modifier de manière appréciable les quantités qu'on peut extraire de collagène acidosoluble.

DISCUSSION.

Les résultats précédents révèlent que l' α -chymotrypsine peut exercer une action « libératrice » sur les mucopolysaccharides acides et sur le collagène soluble présents dans le tissu sous-cutané du rat. Nous admettons, pour notre part, que la « libération » ainsi constatée traduit une action protéolytique exercée par l'enzyme sur une protéine non fibrillaire de la trame ; cette protéine se trouverait liée, plus ou moins fortement, aux mucopolysaccharides acides et au collagène neutrosoluble.

Il est évident qu'une telle action rappelle celle qui a été observée par différents auteurs [7] et par nous-mêmes [8] au niveau de *cartilages* de lapins traités, *in vivo* et *in vitro*, par de la papaïne. La papaïne, en détruisant électivement la protéine de la chondromucoprotéine, libère des molécules d'acides chondroïtine-sulfuriques qui, normalement, sont attachées à cette protéine [7]. En même temps, elle facilite l'extraction, à partir du cartilage, du collagène [8].

Une différence assez nette, toutefois, se manifeste. Dans le cas du cartilage, l'action de l'enzyme protéolytique mise en œuvre entraîne une libération simultanée des collagènes neutrosoluble et acidosoluble. Au contraire, dans le cas du tissu sous-cutané, l'enzyme ne parvient à « libérer » que le collagène neutrosoluble.

Pourquoi cette différence ? Elle tient sans doute à plusieurs causes. Les deux tissus étudiés : cartilage et trame sous-cutanée n'ont pas une architecture identique. Les expériences rapportées concernent des animaux d'espèces différentes : lapins et rats. Les enzymes utilisées ne sont pas les mêmes : papaïne chez le lapin, α -chymotrypsine chez le rat.

Quoi qu'il en soit, les faits obtenus avec l' α -chymotrypsine et

rapportés dans cette note nous paraissent assez nets pour qu'ils puissent être considérés déjà comme un nouvel argument en faveur de notre théorie des liaisons [9]. Nous rappelons que, d'après celle-ci, le bon fonctionnement de la trame conjonctive serait, en dernière analyse, sous la dépendance de liaisons chimiques convenables établies entre les divers éléments constitutifs de cette trame. Certes, la protéine détruite ici par l' α -chymotrypsine ne paraît pas jouer autant que celle présente dans la chondromucoprotéine le rôle d'une « protéine-cheville » (sans cela, du collagène acidosoluble aurait aussi été libéré). Son action, toutefois, n'apparaît pas douteuse.

Ceci dit, il va de soi que les résultats ici présentés sont encore trop fragmentaires pour permettre de déterminer le rôle qu'assumeraient des enzymes protéolytiques mastocytaires dans la mise en liberté de mucopolysaccharides, qu'il s'agisse de ceux présents dans les mastocytes (nous faisons ici allusion aux phénomènes de « dégranulation ») ou de ceux qui se trouvent dans la trame à une phase préliminaire du catabolisme. Des recherches en cours élucideront probablement la chose. Des examens de coupes seront aussi nécessaires pour que soient précisées les modifications d'ordre histologique et histochimique qu'entraîne, dans la trame sous-cutanée du rat, l'action de l' α -chymotrypsine.

Un point, enfin, mériterait d'être éclairci : pourquoi les résultats obtenus avec cette enzyme et présentés ci-dessus ont-ils été plus nets *in vivo* qu'*in vitro* ? C'est peut-être parce que des inhibiteurs plasmatiques sont parvenus à exercer, *in vitro*, une action plus forte.

RÉSUMÉ.

L' α -chymotrypsine, utilisée *in vivo* ou *in vitro*, facilite la libération, à partir du tissu sous-cutané du rat, des mucopolysaccharides acides et du collagène neutrosoluble ; sans doute parce qu'elle détruit une protéine qui, normalement, attache les uns aux autres ces différents corps. Les auteurs rapprochent de ces observations celles effectuées, au niveau du cartilage de lapin, avec la papaïne.

SUMMARY.

EFFECTS OF α -CHYMOTRYPSINE ON RAT SUBCUTANEOUS TISSUE.

In vivo and *in vitro*, α -chymotrypsin provokes the liberation of acid mucopolysaccharides and neutral soluble collagen from subcutaneous tissue of rats. This fact is probably due to the enzymic breakdown of a protein which is normally bound to both substances. The authors compare their observations with those obtained with papain on rabbit ear cartilage.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] ASBOE-HANSEN (G.). *On the structure and functions of the mast cell*, in *Connective Tissue Symposium*, 1 vol., Oxford, 1957, Blackwell Scient. Publ., p. 12.
- [2] BENDITT (E. P.) et ARASE (M.). *J. exp. Med.*, 1959, **110**, 451.
- [3] GLEMER (G. G.) et COHEN (L. A.). *Nature*, 1960, **185**, 846.
- [4] NEUMAN (R. E.) et LOGAN (M. A.). *J. biol. Chem.*, 1950, **184**, 299.
- [5] KORN (E. D.). *J. biol. Chem.*, 1959, **234**, 1325.
- [6] DISCHE (Z.). *Meth. bioch. Anal.*, 1955, **2**, 313.
- [7] THOMAS (L.). *J. exp. Med.*, 1956, **104**, 245. — McCLUSKEY (R. T.) et THOMAS (L.). *J. exp. Med.*, 1958, **108**, 371. — BRYANT (J. H.), LEDER (J. G.) et STETTEN (D. W.). *Arch. Bioch.*, 1958, **76**, 122. — TSALTAS (T. T.). *J. exp. Med.*, 1958, **108**, 507.
- [8] BAZIN (S.) et DELAUNAY (A.). *Ann. Inst. Pasteur (sous presse)*.
- [9] DELAUNAY (A.), BAZIN (S.), HENON (M.) et FAUVE (R.). *Les liaisons collagène-polyosides et leur importance en pathologie*. Rapport au I^{er} Congrès international de Pathologie infectieuse, Lyon, 25 mai 1956 ; *Giorn. Mal. inf.*, numéro extraordinaire, 1956, p. 54. — DELAUNAY (A.) et BAZIN (S.). *Combinaisons in vitro collagène-mucopolysaccharides et modifications apportées à ces combinaisons par des sels et des polyosides bactériens*, in *Connective Tissue Symposium*, 1 vol., Oxford, 1957, Blackwell Scient. Publ., p. 105. — DELAUNAY (A.) et BAZIN (S.). *Etude biologique et pathologique du collagène*. Rapport au XXXI^e Congrès de Médecine, Paris, 16 octobre 1957, Vol. du Congrès, Masson, édit., p. 41. — DELAUNAY (A.) et BAZIN (S.). *Communication au II^e Symposium international sur les maladies du collagène*, Milan, 3-4 novembre 1957 ; *I piu recenti aggiornamenti in tema di malattie del collagene*, 1 vol., Milan, 1958, Ganassini, édit., p. 29.

LA CROISSANCE DE *CL. SPOROGENES* ÉTUDIÉE AU MICROBIOPHOTOMÈTRE ÉLECTRONIQUE

I. — ACTIONS COMPARÉES DE Ni^{++} ET DE Co^{++}

par M. FAGUET (*).

(Institut Pasteur, Service des Bactériophages)

Dans un travail précédent, nous avons décrit une technique permettant l'enregistrement, en milieu liquide, des courbes de croissance microbienne [1]. Cette technique permet, pour chaque expérience, d'obtenir simultanément les courbes de multiplication de six cultures, placées dans des conditions différentes.

Nous avons utilisé, aujourd'hui, cette méthode pour étudier le développement *in vitro* de *Cl. sporogenes* et pour rechercher l'influence sur sa croissance, des ions Co^{++} et Ni^{++} . Cette question paraît toucher à celle des oligo-éléments qui eut Gabriel Bertrand [2] pour initiateur, dès 1894. En réalité, ce n'est pas sous cet angle que nous avons étudié ces actions et les doses que nous avons employées sont très supérieures à celles que l'on trouve habituellement dans la nature. D'ailleurs, nos milieux sont complexes et ces éléments peuvent s'y trouver naturellement à l'état de traces.

MATÉRIEL ET TECHNIQUE.

a) SOUCHE. — La souche de *Cl. sporogenes* provient de la collection de l'Institut Pasteur, où elle est inscrite sous le numéro 6053.

Elle est repiquée chaque jour sur bouillon peptoné glucosé en tube de Prévot et cultivée à la température de 37° C.

b) MILIEU. — Dans ces expériences, nous avons employé un milieu complexe, constitué essentiellement par un bouillon de viande (digestion pepsique), peptoné à 1,5 p. 100 et glucosé à 0,3 p. 100. Le pH était ajusté à 7,4.

c) TECHNIQUE. — Nous avons étudié la croissance par la technique des enregistrements continus à l'aide du microbiophotomètre électronique enregistreur (1).

(*) Société Française de Microbiologie, séance du 10 janvier 1961.

(1) Construit par la Société MECI, Paris.

A tout moment de l'évolution d'une culture, nous connaissons la quantité de germes (fig. 1) et le taux de croissance. Nous pouvons, si cela est nécessaire, suivre l'expérience pendant plusieurs jours sans interrompre la marche de l'appareil.

Chaque culture est faite dans une cuve rappelant le tube de Hall, constituée par un tube de 21 mm de diamètre intérieur, présentant à 77 mm du fond, un étranglement de 8 mm.

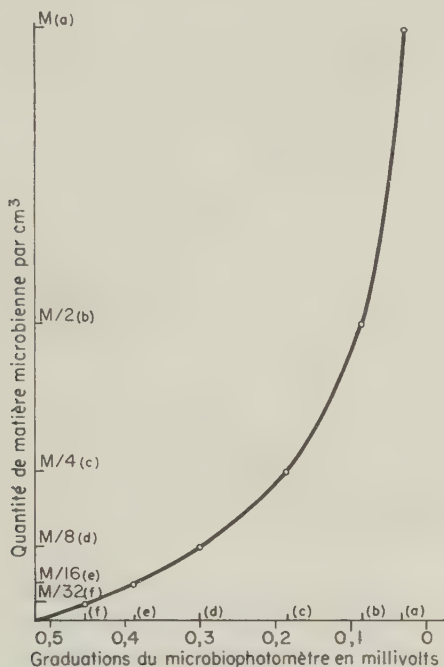


FIG. 1. — Les différents points de cette courbe ont été obtenus en partant d'une culture de *Cl. sporogenes* de quarante-huit heures en bouillon peptoné glucosé (point M). Les points a, b, c, d, e, f, représentent les dilutions au 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32 de la suspension initiale M. Ce point correspond environ à 6×10^9 germes par centimètre cube. Cette courbe permet de connaître la quantité de germes en fonction des indications fournies par le microbiophotomètre.

Le volume du liquide étant de 22 cm³ et sa surface exposée à l'air, de 0,5 cm², nous nous trouvons dans de bonnes conditions d'anaérobiose [3].

L'agitation est assurée par un petit agitateur commandé par un système électromagnétique.

Les courbes de croissance sont directement enregistrées sur une bande de papier se déroulant à la vitesse de 25 mm à l'heure.

d) Nous avons utilisé le sulfate de nickel et le sulfate de cobalt (produit R. P.). Les solutions de SO_4Co , $7\text{H}_2\text{O}$ et de SO_4Ni , $7\text{H}_2\text{O}$ ont été faites en eau distillée, puis stérilisées par filtration sur bougie L3.

RÉSULTATS.

La méthode employée se prête bien à l'étude de cet anaérobie.

1° La croissance de *Cl. sporogenes* seul, en bouillon peptoné faiblement agité (l'air ayant été chassé par vingt-cinq minutes d'ébullition) se traduit par une courbe de croissance (fig. 3, courbe 1).

2° L'addition de SO_4Co , $7\text{H}_2\text{O}$ au milieu détermine une stimu-

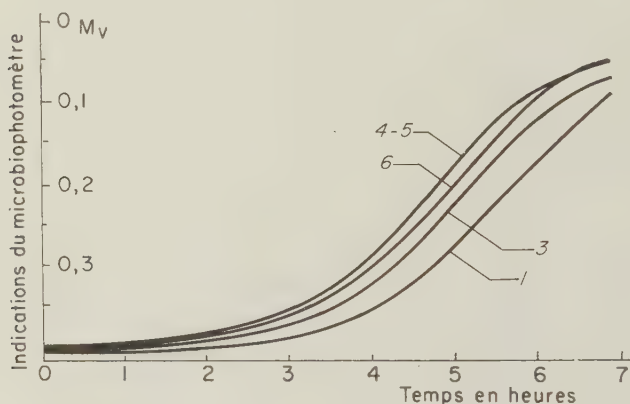


FIG. 2. — Courbes de croissance de *Cl. sporogenes* enregistrées par le microbiophotomètre. La cuve 1 est la culture témoin ; les cuves 3, 4, 5, 6 contiennent respectivement 22 cm³ de bouillon peptoné glucosé et 2,5 mg, 3,75 mg, 5 mg et 6,25 mg de SO_4Co , $7\text{H}_2\text{O}$. On a ensemencé chaque cuve avec 2×10^7 germes par centimètre cube (cultures en tubes avec étranglement ; milieu désaéré par ébullition). [Ces doses correspondent respectivement aux concentrations moléculaires de M/2 500, M/1 600, M/1 250 et M/1 000.]

lation de la culture (fig. 2 et 3), dont la concentration finale en germes (après quarante-huit heures) atteint parfois le double de la culture témoin ; nos résultats rejoignent ceux que Gorbach et coll. [4] ont donné pour *B. asteroides*.

3° L'addition de SO_4Ni , $7\text{H}_2\text{O}$ aux mêmes concentrations que le cobalt détermine une stimulation plus faible (fig. 3).

4° L'addition de cobalt à un milieu de culture placé dans des tubes ordinaires sans étranglement, permet la croissance *Cl. sporogenes* (fig. 4 et 5), alors que, dans les mêmes conditions d'expérience, le nickel à concentration identique n'a permis qu'un très

faible développement. Les milieux témoins, sans aucune addition, n'ont pas permis la culture du germe. Toutefois, dans les condi-

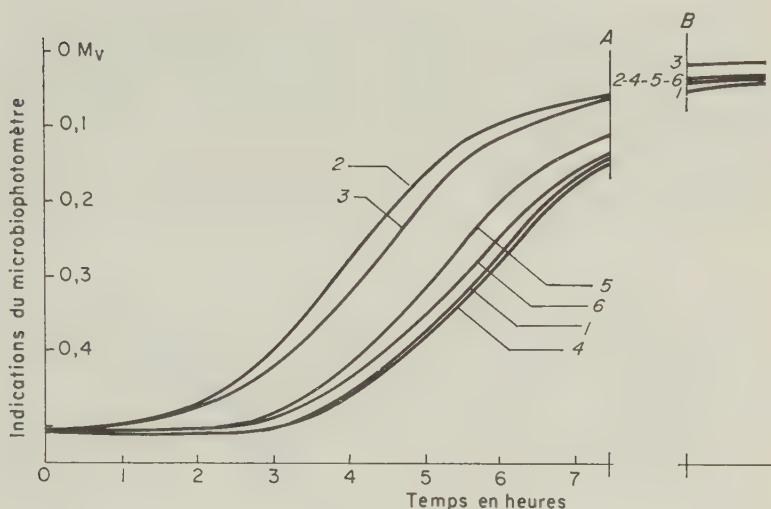


FIG. 3. — Courbes de croissance de *Cl. sporogenes*. La cuve I est la culture témoin. Les cuves 2 et 3 contiennent respectivement 22 cm³ de bouillon peptoné glucosé et 5 mg, 6,25 mg de SO₄Co, 7H₂O ; les cuves 4, 5, 6 : 3,75 mg, 5 mg et 6,25 mg de SO₄Ni, 7H₂O. Chaque cuve a étéensemencée avec 3×10^7 germes par centimètre cube. (Culture en tubes avec étranglement et désaération du milieu par ébullition.) [Concentrations moléculaires respectives de M/1 600, M/1 250 et M/1 000.]

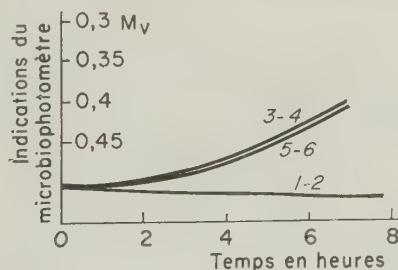


FIG. 4. — Courbes de croissance de *Cl. sporogenes* en tubes de 2/mm sans étranglement et sans agitation. Pas de désaération du milieu. Les cuves 1 et 2 contiennent le milieu ordinaire sans aucune addition. Dans les cuves 3, 4, 5, 6 on a ajouté 6,25 mg de SO₄Co, 7H₂O. (Concentration moléculaire de M/1 000).

tions de nos expériences, les cultures obtenues avec Co⁺⁺ et Ni⁺⁺ ont été très nettement plus faibles qu'en milieu d'où l'air avait été chassé par ébullition.

DISCUSSION.

Il nous a paru intéressant *a priori*, dans l'étude de la croissance d'un germe anaérobie, d'examiner l'action de Co^{++} et de Ni^{++} à cause du rôle important que ces éléments jouent dans la catalyse d'oxydation ou de réduction et dans l'activation de certaines enzymes [5]. Ils appartiennent, dans la classification de Mendéléev, aux séries dites de transition. Leur valence est variable et

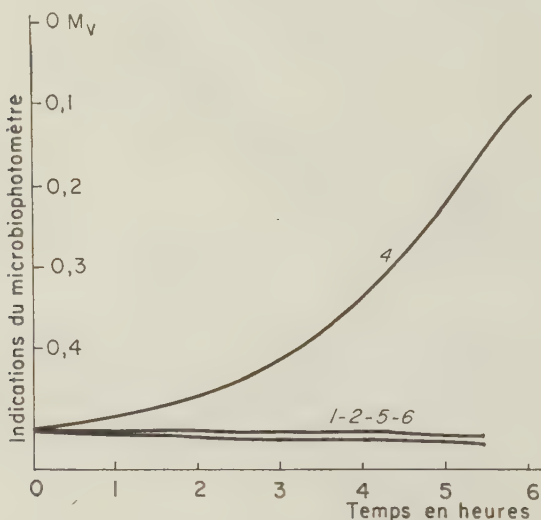


FIG. 5. — Courbes de croissance de *Cl. sporogenes* en tubes de 22 mm sans étranglement. Milieu désaéré par vingt-cinq minutes d'ébullition. Agitation discontinue par de très petits agitateurs de 15 mm de longueur, commandés par un système électromagnétique. Dans la cuve 4 on a ajouté 5 mg de SO_4Co , $7\text{H}_2\text{O}$ et dans les cuves 5 et 6, 5 mg de SO_4Ni , $7\text{H}_2\text{O}$. Cuves 1 et 2 : témoin culture. (Concentration moléculaire dans 4, 5, 6 : M/1 250.)

jamais leurs ions ne prennent la structure des gaz rares qui n'ont aucune propriété chimique et représentent les atomes les plus stables (leur couche externe électronique comprenant une sous-couche « s » et une sous-couche « p » complètes).

Les courbes de *Cl. sporogenes* que nous avons obtenues montrent que la multiplication de ce germe, activée par la présence de nickel à la dose de M/1250, l'est plus encore par celle du cobalt aux mêmes doses. Or les sels que nous avons utilisés, SO_4Ni , $7\text{H}_2\text{O}$ et SO_4Co , $7\text{H}_2\text{O}$, ne diffèrent l'un de l'autre que par la structure électronique des atomes de nickel et de cobalt : au

niveau de la couche externe 3d, le cobalt possède trois électrons non appariés, tandis que le nickel n'en a que deux (ces électrons déterminant le paramagnétisme de leurs ions).

Il n'est pas possible de donner dès maintenant une explication de l'action favorisante, sur la croissance, des ions Ni^{++} et Co^{++} ; mais nous pouvons supposer que leur différence d'action sur la croissance à des concentrations moléculaires identiques ne peut provenir que de cette différence dans leur structure électronique.

Nous pensons pouvoir étudier prochainement ces mécanismes complexes et cette note ne représente qu'un travail préliminaire.

CONCLUSION.

Après avoir montré que le microbiophotomètre électronique peut être utilisé dans l'étude de la croissance de certains anaérobies (*Cl. sporogenes*) dont il permet d'obtenir automatiquement les courbes de croissance, nous avons donné nos premiers résultats concernant l'action des ions Ni^{++} et Co^{++} sur cette croissance.

SUMMARY.

STUDIES ON THE GROWTH OF *Clostridium sporogenes*

I. COMPARATIVE ACTIVITY OF CERTAIN COBALT AND NICKEL SALTS.

The author first demonstrates that the electronic microbiophotometer allows to record growth-curves of anaerobic germs (*Clostridium sporogenes*). He then describes comparative studies on the action of Co^{++} and Ni^{++} ions on the growth of these germs.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] FAGUET (M.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1959, **97**, 177 ; *La photoélectricité dans l'enregistrement de la croissance microbienne*. Préface de J. Tréfouël ; Hermann, édit., Paris, 1941, n° 898.
- [2] BERTRAND (G.) et NAKAMURA (H.). *C. R. Acad. Sci.*, 1927, **185**, 321.
- [3] PRÉVOT (A.-R.). In *Bactériologie Médicale*, 1959, Flammarion, édit., 624.
- [4] GORBACH (G.), DEDIC (G.) et KOCH (O. G.). *Arch. Mikrobiol.*, 1955, **22**, 78.
- [5] CAUJOLLE (F.). *Exp. ann. Bioch. méd.*, 7^e série, 1947, 200. — HAWK (Ph. B.), OSER (B. L.) et SUMMERSON (W. H.). *Pract. physiol. Chem.*, 1954, 311. — LEVY (H. B.), SKUTCH (E. T.) et SCHADE (A. L.). *Arch. Biochem.*, 1949, **24**, 249. — SEUDERLING (Y.). *Acta Soc. Med. Fenn. Duodecim, Ser. A*, 1933, **16**, 1.

LES PROPRIÉTÉS LYTQUES DU SÉRUM

III. — INFLUENCE CHEZ LE SINGE DE LA VACCINATION ANTITYPHOPARATYPHOÏDIQUE SUR LA TENEUR EN OBSISTINE

par L. COLOBERT, A. KIRN, M^{lle} P. SERVANT et B. MONTAGNON (*)
(avec la collaboration technique de M^{lle} R. GOUJEAUD).

(Laboratoire de Bactériologie
de la Section Technique de Recherches et d'Etudes
des Services de Santé des Armées,
avec la collaboration de l'Institut Mérieux, Lyon)

Nous avons individualisé dans le sérum humain normal (1), sous le nom d'obsistine (Colobert et Kirn [3, 4, 5]), un système lytique actif sur diverses espèces de bactéries à Gram négatif, chez lequel ne semblent intervenir ni les anticorps spécifiques, ni le complément. Ce système existe également dans le sérum des singes *Cynocephalus babuin*. Nous avons recherché si, dans le sérum de ces animaux, la vaccination contre les salmonelloses retentissait sur la teneur en obsistine, parallèlement au titre en anticorps agglutinants et à celui de la capacité de protection passive de la souris vis-à-vis de l'infection expérimentale à *Eberthella typhi*.

TECHNIQUES

TITRAGE DE L'OBSISTINE.

Ce titrage est rendu difficile par l'interférence de divers facteurs du sérum. Ainsi, lorsqu'on suit la lyse d'une suspension d'*Eberthella typhi* souche O-901 dans les conditions optima (Colobert et Kirn [3, 4]), on constate que celle-ci ne débute pas immédiatement après l'addition du sérum, mais après un certain temps de latence, variable d'un sujet à l'autre. Pour titrer l'obsistine, il est nécessaire de diluer suffisamment le sérum pour que cet effet devienne

(*) Manuscrit reçu le 1^{er} février 1961.

(1) C'est-à-dire dans le sérum de sujets qui n'ont jamais été vaccinés contre les salmonelloses et pour lesquels on n'a pas la notion de salmonellose dans les antécédents pathologiques.

négligeable. De fait, comme nous l'avons déjà indiqué (Colobert et Kirn [3]), on trouve ordinairement une zone de dilutions où se manifeste une proportionnalité entre l'intensité de la lyse mesurée au bout d'un temps donné et la quantité de sérum utilisée. La pente de la droite représentative, c'est-à-dire la quantité de bactéries détruites au bout d'un temps unité par un volume unité de sérum, peut servir de mesure relative du titre en obsistine. Au point de vue pratique, on commence par réaliser une suspension d'*Eberthella typhi* souche O-901 dans du tampon phosphate 0,066 M de pH 7,2 (2), les bactéries étant récoltées après culture de seize heures à 37° sur gélose nutritive inclinée.

L'opacité de la suspension bactérienne est ajustée de telle manière que la densité optique de cette suspension diluée au 1/4 dans le tampon et mesurée à 700 m μ dans une cuve de 1 cm d'épaisseur, soit égale à 0,83.

Dans une série de tubes à essais, on distribue respectivement 0,10, 0,20, 0,25, 0,30, 0,40 et 0,50 cm³ du sérum à étudier. On complète à 3 cm³ à l'aide du tampon phosphate 0,066 M de pH 7,2. On place dans un thermostat à 37° le flacon contenant la suspension bactérienne et les 6 tubes contenant les dilutions de sérum. Lorsque l'équilibre de la température est réalisé, on ajoute 1 cm³ de la suspension bactérienne dans chacun des tubes. Au bout de trente minutes exactement, on agite et on lit la densité optique. Celle-ci doit être égale à 0,78 dans le tube témoin n'ayant pas reçu de sérum (3). Sur un papier millimétré on porte en abscisses les volumes de sérum utilisés et en ordonnées les densités optiques correspondantes lues à la trentième minute. Habituellement, tous les points obtenus ne sont pas alignés, mais il est en général possible de trouver trois ou quatre points consécutifs alignés permettant de tracer la droite. S'il n'en est pas ainsi, on doit reprendre le titrage avec des volumes de sérum plus faibles : 0,02, 0,05, 0,10, 0,20, 0,25 cm³. Sauf dans des cas exceptionnels auxquels sera consacrée une étude ultérieure, on observe au moins trois points consécutifs alignés permettant de tracer la droite (fig. 1).

On calcule alors la pente de la droite en faisant le rapport, pour une quantité donnée de sérum, de la diminution d'opacité exprimée en densité optique par cette quantité de sérum exprimée en centimètres cubes. Pour éviter que les valeurs ainsi obtenues soient trop petites, on multiplie le résultat par un coefficient égal à 10. Si φ_1 représente la densité optique à la trentième minute

(2) PO₄HNa₂, 12 H₂O : 16,717 g ; PO₄H₂K : 2,723 g pour 1 volume de 1 l.

(3) 60 divisions du tambour du photomètre tricellule Jobin et Yvon.

correspondant à un volume en centimètres cubes v_1 de sérum et φ_2 la densité optique correspondant à un volume v_2 , le titre T est donné par la formule $T = \frac{\varphi_1 - \varphi_2}{v_2 - v_1} \times 10$.

A titre d'exemple, sur la courbe A de la figure 1 on lit que pour 0,2 cm³ de sérum la densité optique correspondante est de 0,73. Pour 0,5 cm³ de sérum elle est de 0,52. La diminution de la densité optique due à la lyse par l'obsistine est donc de $\frac{0,73 - 0,52}{0,5 - 0,2} = 0,7$. En multipliant cette valeur par 10, on obtient le titre du sérum, égal ici à 7 unités/cm³.

Dans le cas de la courbe B de la figure 1, en lisant par

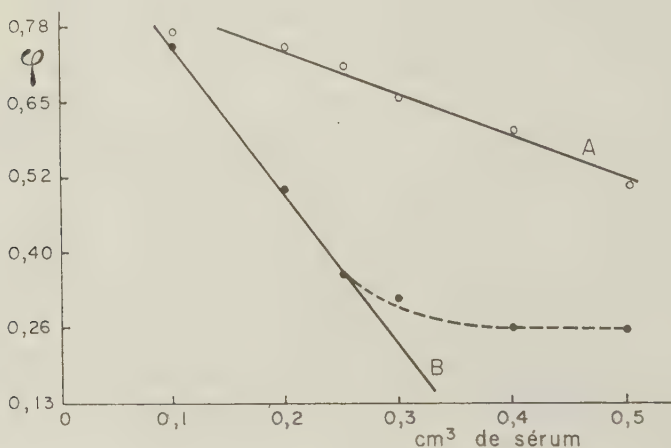


FIG. 1. — Titrage de l'obsistine. En abscisses, le volume de sérum introduit dans la réaction. En ordonnées, la densité optique de la suspension bactérienne au bout de trente minutes à 37° C.

exemple les densités optiques correspondant aux valeurs 0,3 et 0,1 cm³ de sérum, on trouve : $\frac{0,75 - 0,23}{0,3 - 0,1} \times 10 = 26$ unités/cm³.

Si le photomètre utilisé ne donne pas les densités optiques mais des valeurs proportionnelles à celles-ci, il suffit évidemment de multiplier la valeur obtenue par le coefficient de proportionnalité déterminé expérimentalement une fois pour toutes par un étalonnage préalable (4).

(4) Nous tenons à la disposition des expérimentateurs éventuels des sérums-étalons de titre connu.

VACCINATION.

Le vaccin utilisé est le vaccin anti-typhoparatyphoïdique A et B de l'Institut Pasteur de Paris (vaccin anti-TAB). C'est une suspension dans un soluté de chlorure de sodium à 8,5 p. 100 de trois bacilles : typhique, paratyphique A et paratyphique B.

Chaque centimètre cube renferme :

750 millions de bacilles typhiques,

250 millions de bacilles paratyphiques A,

500 millions de bacilles paratyphiques B.

La stérilité du vaccin est assurée par un chauffage d'une heure à 56°. Aucun antiseptique n'est ajouté.

Un lot de cinq singes adultes a reçu par voie sous-cutanée dans la région deltoïdienne à quinze jours d'intervalle, trois injections de vaccin anti-typhoparatyphoïdique A et B de l'Institut Pasteur de Paris (TAB) aux doses suivantes qui sont celles préconisées pour la vaccination des enfants :

Première injection	0,25 cm ³
Deuxième injection	0,50 cm ³
Troisième injection	0,75 cm ³

On a constitué, d'autre part, un lot témoin de quatre singes qui n'ont subi aucune injection.

Des échantillons de sang ont été prélevés par ponction des veines de l'avant-bras chez les animaux des deux lots, d'une part la veille de la première injection (sérum A), d'autre part respectivement dix jours après chacune des injections (sérums B, C et D), enfin quarante-cinq et cent cinq jours après la troisième injection (sérums E et F).

TITRAGE DES ANTICORPS AGGLUTINANTS O ET H.

Ce titrage a été réalisé suivant la méthode classique avec les modalités opératoires décrites par Dumas [6].

EPREUVE DE SÉROPROTECTION SUR LA SOURIS.

La capacité de protéger la souris infectée expérimentalement par *Eberthella typhi* souche Ty2 a été titrée suivant les procédés classiques (Bonnefoi et Grabar [2], Felix et Pitt [7], Grabar et Le Minor [8]) : injection intrapéritonéale à des lots de souris de 0,5 cm³ de dilutions en progression géométrique du sérum à étudier, suivie une heure plus tard par l'injection intrapéritonéale de la dose d'épreuve de bactéries, soit 200.10⁶ bactéries sous un

TABLEAU I. — Variation du titre des agglutinines anti-*Salmonella* para B exprimé par le dénominateur de la dilution limite (titre des agglutinines H dans l'angle supérieur gauche, des agglutinines O dans l'angle inférieur droit).

NUMÉRO D'ORDRE DES SÉRUMS	ANIMAUX TÉMOINS NON VACCINÉS				ANIMAUX VACCINÉS				
	II	I2	I3	I4	6	7	8	9	10
A	0 0	0 0	40 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0
B	0 0	0 0	20 0	0 0	80 80	0 40	20 0	20 0	40 40
C	0 0	0 0	20 0	0 0	160 160	160 20	40 20	80 0	160 80
D	0 0	0 0	20 0	0 0	160 80	320 20	160 0	160 20	80 0
E	0 0	0 0	20 0	0 0	160 20	160 20	160 0	80 0	40 0
F	0 0	0 0	20 0	0 0	80 20	40 20	0 0	0 0	40 0
G	80 40	40 20	20 0	0 0	80 40	40 20	0 0	0 0	40 20
H	80 40	40 20	20 0	20 0	80 40	40 20	0 0	20 0	40 20
I	80 40	40 20	40 20	20 0	80 40	40 20	40 20	0 0	40 40
J	160 40	80 20	40 20	40 20	160 40	40 20	40 20	40 20	80 40
K	80 40	80 40	40 0	20 40	80 40	80 20	40 0	40 0	80 80
L	5 120 320	2 560 80	5 120 160	5 120 80	5 120 320	2 560 80	5 120 160	5 120 80	1 280 80
M	10 240 320	2 560 80	2 560 160	1 280 80	10 240 320	2 560 80	2 560 160	1 280 80	décès

A : prélèvement de sérum avant la première injection. B, C, D : prélèvements respectivement dix jours après la première, deuxième et troisième injection. E : prélèvement quarante-cinq jours après la troisième injection. F : cent dix-sept jours après la troisième injection. G, H, I, J, K : de deux jours en deux jours après le début de l'inoculation *per os*. L : la veille de l'inoculation intrapéritonéale. M : treize jours plus tard.

TABLEAU II. — Variation du titre des agglutinines anti-*Eberthella typhi* exprimé par le dénominateur de la dilution limite (titre des agglutinines H dans l'angle supérieur gauche, des agglutinines O dans l'angle inférieur droit).

NUMÉRO D'ORDRE DES SÉRUMS	ANIMAUX TÉMOINS NON VACCINÉS				ANIMAUX VACCINÉS				
	II	I2	I3	I4	6	7	8	9	10
A	0 0	0 20	0 0	0 0	20 0	0 0	0 0	0 0	20 0
B	0 20	0 20	0 0	0 0	320 1 280	0 80	160 80	160 40	0 20
C	0 20	0 20	0 0	0 0	320 1 280	640 40	160 80	80 20	0 20
D	0 20	0 40	0 0	0 0	160 320	80 80	40 80	80 0	0 40
E	0 20	0 40	0 0	0 0	80 320	80 80	80 40	40 20	0 40
F	0 20	0 20	0 0	0 0	80 80	80 80	80 40	20 0	0 20
G	0 0	0 0	0 0	0 0	80 40	40 20	0 0	0 0	40 20
H	80 0	0 0	40 20	0 0	80 40	40 20	0 0	20 0	40 20
I	160 0	0 0	40 0	80 0	160 40	40 20	40 20	0 0	40 40
J	40 20	0 0	40 0	640 20	80 40	80 20	40 20	40 20	80 40
K	40 20	0 0	40 20	320 20	80 40	80 20	40 0	20 40	80 80
L	1 280 80	2 560 80	5 120 40	2 560 40	5 120 320	2 560 80	5 120 160	5 120 80	1 280 80
M	80 40	80 80	320 80	640 20	10 240 320	2 560 80	2 560 160	1 280 80	décès

A : prélèvement de sérum avant la première injection. B, C, D : prélèvements respectivement dix jours après la première, deuxième et troisième injection. E : prélèvement quarante-cinq jours après la troisième injection. F : cent dix-sept jours après la troisième injection. G, H, I, J, K : de deux jours en deux jours après le début de l'inoculation *per os*. L : la veille de l'inoculation intrapéritonéale. M : treize jours plus tard.

volume de 0,5 cm³ ; la DL₅₀ de la souche utilisée étant de 70.10⁶ (limites de confiance 94.10⁶ et 52.10⁶).

Les résultats obtenus ont été étudiés par la méthode des probits selon Bonét-Maury, Jude et Servant [4]. Ils expriment la dilution de sérum protégeant de l'infection 50 p. 100 des souris contre la dose d'épreuve.

RÉSULTATS

EFFET DE LA VACCINATION ÉVALUÉ PAR LES ANTICORPS AGGLUTINANTS.

Les résultats sont résumés dans les tableaux I et II. On voit que, pour la plupart, les singes ne présentaient pas d'anticorps agglutinants avec la vaccination, ou seulement à des titres très faibles. Les titres n'ont pas varié, à la précision de la méthode près, chez les animaux témoins pendant la durée de l'expérience (A à F inclus) ; en revanche, des anticorps O et H se sont développés chez les singes vaccinés ; ils ont atteint des titres faibles, sauf dans le cas des anticorps anti-TO chez l'animal n° 6. Il n'est pas apparu d'anticorps anti-para A.

EFFET DE LA VACCINATION ÉVALUÉ PAR L'ÉPREUVE DE SÉROPROTECTION SUR LA SOURIS.

Le tableau III groupe les résultats. On voit que dans le cas des 4 singes témoins, la dilution de sérum assurant sur la souris 50 p. 100 de protection vis-à-vis de la dose d'épreuve, varie peu pendant la durée de l'expérience, le titre moyen étant de 1/9.

Tout au contraire, chez les animaux vaccinés par le vaccin

TABLEAU III. — Variation du taux de dilution des sérums assurant 50 p. 100 de protection chez les souris.

SÉRUMS	NUMÉRO DES ANIMAUX TÉMOINS				NUMÉRO DES ANIMAUX AYANT REÇU SEULEMENT LE VACCIN ANTI TAB				
	II	I2	I3	I4	6	7	8	9	10
A	1/15	1/15	1/16	1/16	1/16	1/15	1/15	1/17	1/11
B	1/13	1/16	1/30	1/18	1/32	1/64	1/60	1/25	1/30
C	1/16	1/22	1/31	1/15	1/154	1/145	1/150	1/154	1/125
D ...	1/18	1/20	1/15	1/19	1/110	1/125	1/154	1/120	1/115
E	1/21	1/7	1/21	1/7	1/43	1/12	1/12	1/19	1/19

Les échantillons de sérum, A, B, C, D et E ont été respectivement prélevés avant la vaccination, dix jours après la première injection, dix jours après la deuxième, dix jours et quarante-cinq jours après la troisième.

anti TAB seul, on note après la troisième injection une augmentation du pouvoir protecteur du sérum dont le titre moyen est de $1/125$. Les 5 animaux subissent une évolution parallèle, les titres atteignent leur maximum dix jours après la deuxième injection ; la troisième n'entraîne aucun bénéfice à ce point de vue. Les titres se retrouvent à leur valeur initiale quarante-cinq jours après la dernière injection.

EFFET DE LA VACCINATION ÉVALUÉ PAR LE TITRAGE DE L'OBSISTINE.

Les résultats sont résumés par les figures 2, 3 et 4. Sur la figure 4, construite à partir des moyennes des titres en obsistine établies sur chacun des deux lots de singes, on voit que pendant

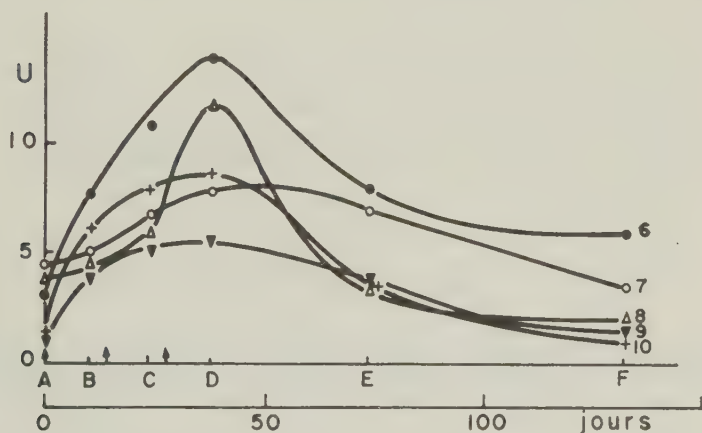


FIG. 2. — Evolution individuelle du titre de l'obsistine chez les singes 6, 7, 8, 9 et 10 ayant reçu le vaccin TAB. Les flèches indiquent le moment des injections, les lettres celui des prélèvements de sérum.

les cent trente-deux jours qu'a duré l'observation, le titre en obsistine relativement élevé au départ ($2,4 \text{ unités/cm}^3$), demeure parfaitement stable (courbe A). Au contraire, dans le lot de singes vaccinés (courbe B) le titre s'élève régulièrement après chaque injection pour atteindre une valeur maximum dix jours après la dernière. Il décroît ensuite petit à petit, mais trois mois et demi plus tard, il demeure encore nettement plus élevé qu'au départ (3 unités/cm^3).

Les figures 2 et 3 confirment ces notions pour chaque animal individuellement.

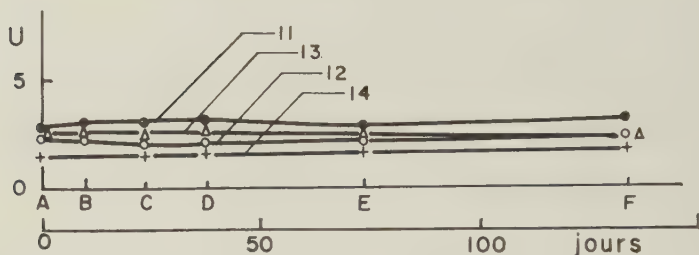


FIG. 3. — Evolution individuelle du titre de l'obsistine chez les 4 animaux témoins (11, 12, 13 et 14). Les lettres indiquent le moment des prélèvements de sérum.

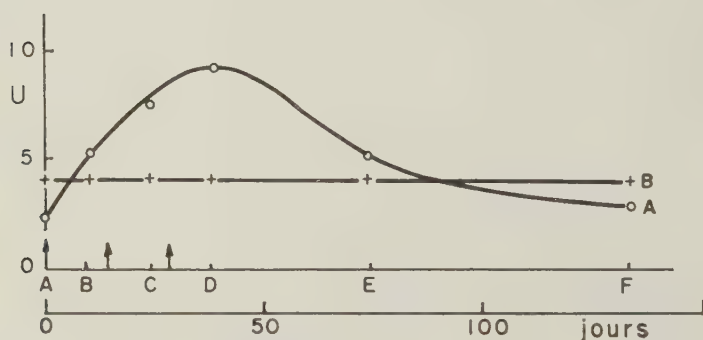


FIG. 4. — Evolution du titre de l'obsistine chez les animaux ayant reçu le vaccin TAB (A) et les animaux témoins (B), évaluée par la valeur moyenne des titres individuels. Les flèches indiquent le moment des injections, les lettres celui des prélèvements de sérum.

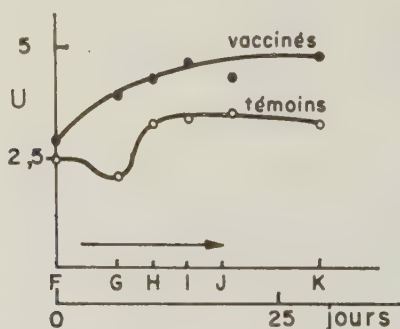


FIG. 5. — Evolution de l'obsistine chez les animaux vaccinés et les témoins à la suite de l'ingestion de *S. para B*, évaluée par la valeur moyenne des titres individuels. La flèche indique la durée de l'ingestion, les lettres le moment des prélèvements de sérum.

RÉACTION A UNE TENTATIVE D'INFECTION EXPÉRIMENTALE PAR VOIE ORALE.

Cent cinq jours après la dernière injection vaccinale, on a fait ingérer aux singes des deux lots une quantité relativement faible de *Salmonella para B* vivantes. Cette inoculation répétée deux fois par jour pendant dix-huit jours consécutifs, a été réalisée en introduisant dans une banane une goutte d'un mélange de culture de dix-huit heures sur bouillon nutritif de 6 souches de *Salmonella para B* récemment isolées chez l'homme. Les prélèvements de sérums G, H, I et J ont été pratiqués respectivement quatre, huit, onze, quinze et vingt-deux jours après le premier repas infectant. Alors qu'aucun symptôme clinique ne s'est manifesté, on a vu s'élever dans le sérum des animaux le titre de l'obsistine, quoique de manière différente dans les deux lots : chez les singes vaccinés la montée de l'obsistine est plus intense et plus précoce que chez les singes non vaccinés (fig. 5).

On trouve dans les tableaux I et II les résultats du titrage des anticorps agglutinants (sérums G, H, I et J). On voit qu'ils apparaissent, mais avec un titre faible, chez les animaux témoins qui n'en possédaient pas.

RÉACTION A UNE TENTATIVE EXPÉRIMENTALE D'INFECTION PAR VOIE PÉRITONÉALE.

Quatre jours après la dernière ingestion de bactéries, on a injecté par voie péritonéale à chacun des animaux ayant servi aux expériences précédentes, 10 cm³ du mélange des cultures de dix-huit heures en bouillon des 6 souches de *S. para B* déjà utilisées par voie orale.

Quinze minutes après l'injection, les singes ont présenté un choc intense avec prostration et vomissements. Ces symptômes ont disparu progressivement en vingt-quatre ou quarante-huit heures.

Dans le but de vérifier la nature de l'agent responsable du choc, on a injecté à un singe neuf, par voie péritonéale, 10 cm³ de bouillon non ensemencé, et à un autre singe neuf, 10 cm³ de filtrat sur bougie de la culture de dix-huit heures. Ces animaux n'ont présenté aucun trouble ; le choc est donc imputable aux corps bactériens et non à des substances solubles.

L'inoculation de ces doses massives de bactéries n'a déclenché aucune infection, tant chez les animaux non vaccinés que chez les animaux vaccinés, et les hémocultures se sont révélées constamment négatives.

La figure 6 concrétise les variations observées du titre de l'obsistine. On a observé chez tous les animaux une réponse progressive, plus importante chez les singes vaccinés où les valeurs obtenues sont en général supérieures à celles observées à la fin de la vaccination ; seul le singe n° 10 a fait exception, mais il était manifestement atteint d'une affection intercurrente et il mourut quatorze jours après l'injection intrapéritonéale. L'autopsie n'a pas permis d'éclaircir la cause de sa mort.

Les tableaux I et II mettent en évidence l'évolution du taux des anticorps agglutinants (sérums K, L, M et N, prélevés respectivement immédiatement avant l'injection péritonéale, puis neuf,

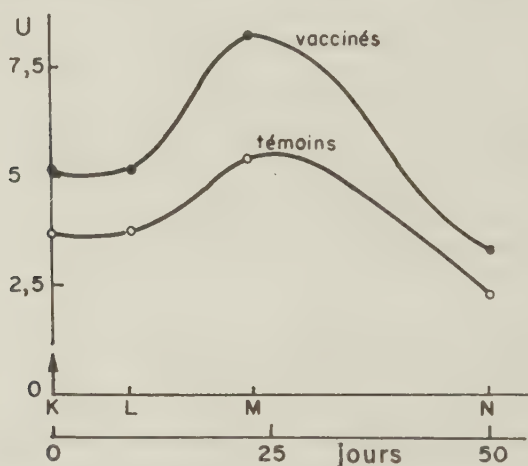


FIG. 6. — Evolution du titre de l'obsistine après l'injection intrapéritonéale de *S. para* B (K), évaluée par la valeur moyenne des titres individuels chez les animaux vaccinés et chez les témoins. La flèche indique le moment de l'injection, les lettres celui des prélèvements de sérum.

vingt-trois et cinquante jours après celle-ci). Les anticorps O s'élèvent peu. En revanche, les anticorps H atteignent des titres élevés. Ceux-ci commencent à décroître dès le quatorzième jour chez les animaux non vaccinés, alors qu'ils demeurent stables chez les animaux vaccinés.

DISCUSSION.

Dans l'état actuel des connaissances, il n'existe pas d'épreuve de laboratoire permettant d'estimer avec quelque certitude le degré de l'immunité obtenue par la vaccination contre les salmonelloses. On a certes observé que celle-ci provoque, tant chez

l'homme que chez les animaux, l'apparition d'anticorps divers en même temps qu'une immunité acquise se développe vis-à-vis d'une infection ultérieure naturelle ou expérimentale, mais si la corrélation est certaine, il semble bien que le second phénomène ne soit pas lié au premier par une relation directe de cause à effet.

On s'est évidemment demandé si le système lytique non spécifique que constitue l'obsistine ne jouerait par un rôle dans l'immunité acquise par la vaccination. De fait, nous estimons avoir établi que l'obsistine participe de manière active à la réaction de l'organisme contre une tentative d'infection *per os*, d'une manière analogue mais non parallèle aux anticorps agglutinants. Bien qu'aucune infection ne se soit manifestée malgré la répétition des inoculations, la montée du titre de l'obsistine et l'apparition d'anticorps agglutinants dans le sérum témoignent que les salmonelles inoculées ont traversé la paroi intestinale puis se sont trouvées secondairement détruites.

Les injections de vaccin antityphoparatyphoïdique A et B suscitent à la fois une élévation progressive et considérable du taux de l'obsistine, l'apparition d'anticorps spécifiques agglutinants à un titre faible et le développement d'un pouvoir de séroprotection vis-à-vis de l'infection expérimentale de la souris. Ces trois phénomènes sont manifestement en corrélation, mais il n'existe aucun parallélisme entre eux. Ainsi la persistance des anticorps agglutinants paraît bien plus durable que celle du pouvoir de séroprotection qui disparaît en un mois et demi et que celle de l'obsistine qui se retrouve au titre initial trois mois et demi environ après la dernière injection.

Cette dissociation se constate également dans les modalités de réaction à l'inoculation *per os*. Les animaux témoins développent des anticorps anti-*Eberthella typhi* (tableau I) qui atteignent les mêmes titres que ceux des animaux antérieurement vaccinés. Au contraire, pour ce qui est de l'obsistine, on observe des différences marquées entre ces deux groupes d'animaux. Chez les vaccinés l'élévation du titre en obsistine est plus intense et plus précoce que chez les témoins. De même après l'injection intrapéritonéale d'une dose énorme de *S. para B*, les titres des anticorps agglutinants sont de même ordre dans les deux groupes d'animaux, alors que la réponse de l'obsistine est beaucoup plus marquée chez les sujets antérieurement vaccinés.

CONCLUSION.

Chez le singe, l'obsistine participe à la réaction de l'organisme au cours de la vaccination contre les salmonelloses, d'une manière analogue mais non parallèle à celle des anticorps agglutinants et du pouvoir de séroprotection contre l'infection expéri-

mentale de la souris. Le titre de l'obsistine atteint son maximum dix jours après la troisième injection vaccinale et se retrouve à sa valeur initiale trois mois et demi environ après celle-ci. A ce moment, l'ingestion de salmonelles vivantes provoque une montée du taux d'obsistine dans le sérum, qui se présente avec des caractères différents chez les animaux antérieurement vaccinés ou les animaux non vaccinés ; chez les premiers la montée est plus intense et plus précoce.

L'injection intrapéritonéale d'une quantité massive de *S. para B* ne permet pas, elle non plus, de déclencher une infection, mais provoque une élévation intense du titre de l'obsistine dans le sérum, non parallèle à celle des anticorps agglutinants.

SUMMARY

LYTIC PROPERTIES OF SERUM.

III. INFLUENCE IN MONKEYS OF ANTI-TYPHO-PARATYPHOID VACCINATION ON THE LEVEL OF OBSISTIN.

In monkeys obsistin takes part in the reaction of the organism to anti-*Salmonella* immunization. Its comportment is comparable, but not identical, to that of the agglutinating antibodies and that of the seroprotection capacity in experimental infection of mice.

The titer of obsistin is maximal ten days after the third immunizing injection and reaches its initial level about three months and a half after this injection. At this moment, the ingestion of living *Salmonella* induces an increase of the serum level of obsistin ; this increase is different in previously immunized and in non immunized animals ; in the former it is earlier and more intensive.

The intraperitoneal injection of a massive amount of *Salmonella paratyphi B* does not induce any infection, but a strong increase of the serum level of obsistin, which is not parallel to that of the agglutinating antibodies.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] BONÉT-MAURY (P.), JUDE (A.) et SERVANT (P.). *Rev. Immunol.*, 1954, **18**, 21.
- [2] BONNEFOI (A.) et GRABAR (M^{me} J.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1947, **73**, 259.
- [3] COLOBERT (L.) et KIRN (A.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1960, **99**, 69.
- [4] COLOBERT (L.) et KIRN (A.). *C. R. Soc. Biol.*, 1960, **454**, 600.
- [5] COLOBERT (L.) et KIRN (A.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1961, **100**, 159.
- [6] DUMAS (J.) et coll. *Bactériologie médicale*, 1958, Flammarion, édit., Paris.
- [7] FELIX (A.) et PITT (R. M.). *Lancet*, 1934, **227**, 186.
- [8] GRABAR (M^{me} J.) et LE MINOR (M^{me} S.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1955, **88**, 601.

LES PROPRIÉTÉS LYTQUES DU SÉRUM

IV. — INTERFÉRENCE DU VACCIN ANTIPOLIOMYÉLITIQUE SUR LA MONTÉE DE L'OBSISTINE PROVOQUÉE CHEZ LE SINGE PAR LA VACCINATION ANTITYPHOPARATYPHOÏDIQUE A ET B

par L. COLOBERT, A. KIRN, B. MONTAGNON et M^{lle} P. SERVANT (*)

(avec la collaboration technique de M^{lle} R. GOUJEAUD).

*(Laboratoire de Bactériologie de la Section Technique
de Recherches et d'Etudes des Services de Santé des Armées,
avec la collaboration de l'Institut Mérieux, Lyon)*

Une expérimentation conduite sur l'homme nous ayant fait soupçonner que l'association du vaccin antipoliomyélitique au vaccin antityphoparatyphoïdique perturbait les réactions habituelles de l'organisme vis-à-vis des salmonelles, nous avons repris cette étude chez le singe (*Cynocephalus babuin*) en étudiant parallèlement le développement des anticorps agglutinants, celui de la capacité de séroprotection vis-à-vis de l'infection expérimentale chez la souris d'une part et chez l'embryon de poulet d'autre part, enfin la montée du titre de l'obsistine du sérum. Les techniques utilisées sont celles décrites dans un mémoire antérieur (Colobert, Kirn, Servant et Montagnon [1]). Le titrage de la capacité de séroprotection sur l'embryon de poulet a été réalisé par la technique de M^{mes} Grabar et Le Minor [2].

Le vaccin antityphoparatyphoïdique A et B (TAB) est le vaccin de l'Institut Pasteur de Paris, le vaccin antipoliomyélitique est celui de l'Institut Mérieux de Lyon (vaccin Lépine, licence de l'Institut Pasteur). A un lot de 4 animaux on a pratiqué par voie sous-cutanée dans la région deltoïdienne, trois injections à quinze jours d'intervalle respectivement de 0,25, 0,50 et 0,75 cm³ de vaccin anti TAB mélangé chaque fois à 1 cm³ de vaccin antipoliomyélitique. Cette expérience a été réalisée en même temps que celle décrite dans un mémoire précédent (Colobert, Kirn, Servant et Montagnon [1]), ce qui permet d'établir une comparaison avec la vaccination par le vaccin anti TAB seul.

(*) Manuscrit reçu le 1^{er} février 1961.

RÉSULTATS ET DISCUSSION.

Les résultats du titrage des anticorps agglutinants sont présentés dans le tableau I que l'on comparera aux tableaux I et II d'un mémoire précédent (Colobert, Kirn, Servant et Monta-

TABEAU I. — Variation du titre des agglutinines anti-*Salmonella para B* et anti-*Eberthella typhi* chez les animaux ayant reçu le mélange des deux vaccins. Le titre est exprimé par le dénominateur de la dilution limite (titre des agglutinines H dans l'angle supérieur gauche, des agglutinines O dans l'angle inférieur droit).

DATE DES PRÉLÈVEMENTS DE SÉRUM	ANTICORPS ANTI <i>S. para B</i> numéro des animaux				ANTICORPS ANTI <i>E typhi</i> numéro des animaux			
	II	IV	V	VII	II	IV	V	VII
A	0	0	0	320	0	0	0	80
	0	0	0	80	0	0	0	0
B	160	40	80	40	20	40	0	20
	80	80	20	80	0	0	0	40
C	320	40	80	40	320	320	80	40
	160	80	80	80	0	20	0	40
D	80	160	160	80	160	160	320	40
	40	160	40	160	40	40	0	40
E	80	40	80	20	160	160	160	40
	40	40	20	160	0	0	0	20
F	80	20	40	40	40	40	40	0
	40	20	40	40	0	0	0	20

A : prélèvement la veille de la première injection. B, C, D : prélèvements respectivement dix jours après la première, deuxième et troisième injection. E et F : prélèvements respectivement quarante-cinq et cent dix-sept jours après la troisième injection.

gnon [1]). La montée du titre des anticorps agglutinants chez les animaux qui ont reçu le mélange des deux vaccins semble notablement moins accusée que chez les animaux traités par le vaccin anti TAB seul.

De même le développement des facteurs assurant la séroprotec-

tion de la souris paraît modifié (tableau II). La montée du titre est retardée chez tous les animaux (Colobert, Kirn, Servant et Montagnon [4]) et, si elle atteint une valeur normale chez les animaux II et V, elle est fortement diminuée chez les animaux IV et VII.

TABLEAU II. — Variation du taux de dilution des sérums, assurant 50 p. 100 de protection chez la souris.

DATE DES PRÉLÈVEMENTS DE SÉRUM	NUMÉRO DES ANIMAUX			
	II	IV	V	VII
A	1/10	1/30	1/29	1/22
B	1/43	1/44	1/32	1/56
C	1/35	1/42	1/66	1/71
D	1/120	1/45	1/165	1/68
E	1/13	1/24	1/10	1/25

A : échantillon de sérum prélevé la veille de la première injection. B, C, D : échantillons de sérum prélevés dix jours après chacune des injections du mélange des vaccins. E : échantillon de sérum prélevé quarante-cinq jours après la dernière injection.

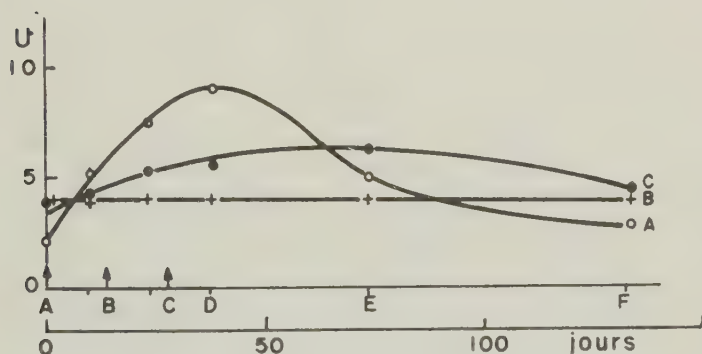


FIG. 1. — Evolution du titre de l'obsistine chez les animaux ayant reçu le vaccin TAB (A), ceux ayant reçu le mélange des deux vaccins (C) et les animaux témoins (B), évaluée par la valeur moyenne des titres individuels. Les flèches indiquent le moment des injections, les lettres celui des prélèvements de sérum.

Les résultats du titrage des facteurs assurant la séroprotection de l'embryon de poulet présentant des fluctuations importantes difficiles à interpréter, ne sont pas exploitables.

Les différences sont plus marquées pour ce qui est de l'obsistine. Les figures 1 et 2 comparées aux figures 2, 3 et 4 d'un

mémoire précédent (Colobert, Kirn, Servant et Montagnon [4]), concrétisent les résultats. La montée du titre de l'obsistine chez les animaux qui ont reçu le mélange des deux vaccins est beaucoup moins intense que chez les animaux qui reçoivent le vaccin TAB seul ; en revanche elle paraît durer davantage.

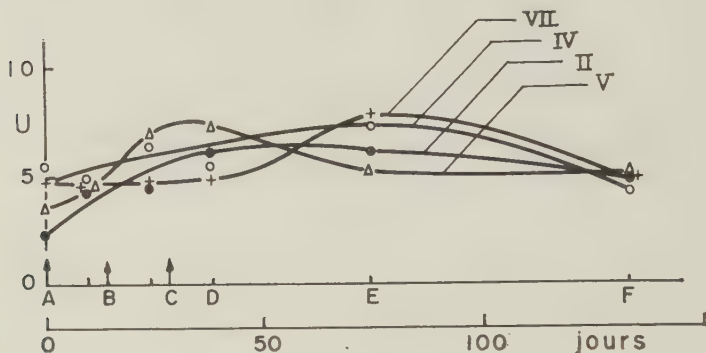


FIG. 2. — Evolution individuelle du titre de l'obsistine chez les singes II, IV, V et VII, ayant reçu le mélange des deux vaccins. Les flèches indiquent le moment des injections, les lettres celui des prélèvements de sérum.

CONCLUSION.

L'association du vaccin antipoliomyélitique au vaccin antityphoparatyphoïdique A et B, perturbe chez le singe les réactions habituelles de l'organisme vis-à-vis des salmonelles. Le développement des anticorps agglutinants et des facteurs responsables de la séroprotection de la souris vis-à-vis de l'infection expérimentale est diminué ou ralenti ; mais la modification la plus marquée se manifeste dans l'évolution du titre de l'obsistine du sérum. Chez les animaux qui ont reçu le mélange du vaccin antipoliomyélitique et du vaccin anti-typhoparatyphoïdique, la montée du titre de l'obsistine est beaucoup moins marquée que celle observée chez les animaux qui ont reçu le vaccin antityphoparatyphoïdique seul.

SUMMARY.

LYTIC PROPERTIES OF SERUM.

IV. INTERFERENCE OF ANTI-POLIO VACCINE ON THE INCREASE OF OBSISTIN INDUCED IN MONKEYS BY ANTI-TYPHOID-PARATYPHOID VACCINE.

The association of anti-polio vaccine with anti-typhoid-paratyphoid A and B vaccine disturbs the normal reactions to *Salmonella* in monkeys. The development of agglutinating anti-

bodies and of the factors responsible for seroprotection in experimental infection of mice is decreased or slowed down, but the most striking change is observed in the evolution of the serum level of obsistin. In animals inoculated with a mixture of anti-polio vaccine + anti-typhoid-paratyphoid vaccine, the increase of the obsistin level is much less marked than in animals injected with anti-typhoid-paratyphoid vaccine alone.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] COLOBERT (L.), KIRN (A.), SERVANT (P.) et MONTAGNON (B.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1961, **100**, 600.
- [2] GRABAR (M^{me} J.) et LE MINOR (M^{me} S.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1951, **81**, 529.

ÉTUDE IMMUNOCHIMIQUE SUR LES *SALMONELLA*

VIII. RÔLE DES GROUPEMENTS O ACÉTYLS DANS LA SPÉCIFICITÉ DU FACTEUR O : 5 (*)

par K. KOTELKO (**), A. M. STAUB et R. TINELLI (***).

(Institut Pasteur)

Le facteur 5 des *Salmonella* du groupe B possède des propriétés qui le distinguent fortement des autres facteurs O de la classification de Kauffmann-White. Tout d'abord il est beaucoup moins stable que la plupart d'entre eux. En chauffant à 120° les suspensions des germes qui contiennent le facteur 5, Kauffmann [9] a établi que leur pouvoir agglutinogène pour le facteur 5 était complètement détruit et leur agglutinabilité fortement diminuée. Ce facteur est aussi détruit par l'action de HCl N pendant vingt heures à 37°, alors que le facteur 4 résiste dans les mêmes conditions (Kauffmann [10]). Mais c'est surtout en milieu alcalin qu'il est détruit le plus vite, ce qui le distingue d'une façon plus nette du facteur 4 et des autres facteurs O. Ce fait a été établi par Furth et Landsteiner [5], qui appelaient alors facteur 1 notre actuel facteur 5, et confirmé depuis par plusieurs autres auteurs [2, 5, 15] : d'après Furth et Landsteiner, le facteur 5 est complètement détruit en milieu sodique 0,01 N après une heure à la température du laboratoire.

Un autre caractère spécial du facteur 5 est sa propriété de rendre partiellement inagglutinables par les anticorps 4 les germes qui le possèdent.

Par ces propriétés particulières, il ressemble à l'antigène Vi de Felix ; aussi cet auteur a-t-il voulu le considérer comme un antigène Vi du groupe B [2]. Kauffmann, qui s'est opposé à cette opinion, avait classé pendant plusieurs années le facteur 5 parmi les facteurs O somatiques ; mais en 1951 [10] il a proposé de le placer avec les antigènes Vi et M des *Salmonella* dans un nou-

(*) Les nos I, II, III, V et VI ont paru dans les *Annales d'Institut Pasteur*, les nos IV et VII ont paru dans le *Bulletin de la Société de Chimie biologique*.

(**) Adresse actuelle : Nowotki 18, Zaklad Microbiologii, Lodz (Pologne).

(***) Manuscrit reçu le 10 janvier 1961.

veau groupe : les antigènes K (Kapselantigene). Bien que cet auteur les ait classés dans le même groupe, il les considère comme des types antigéniques différents, qui se caractérisent par différentes propriétés biochimiques et sérologiques, mais qui ont entre eux des ressemblances remarquables qui les distinguent des antigènes somatiques.

Enfin, le facteur 5 serait responsable [15] de la parenté sérologique entre les souches de *Salmonella* qui le contiennent et l'antigène de Forssman.

Dans ce travail nous avons tenté d'établir la position du facteur 5 parmi les antigènes des *Salmonella*, ainsi que de détecter la structure chimique responsable de sa spécificité immunologique.

MATÉRIEL ET TECHNIQUES.

SOUCHES UTILISÉES POUR LA PRÉPARATION DU POLYOSIDE. — Nous avons utilisé la souche de *Salmonella typhi murium* (4,5,12) (1) [souche glasgow 0] et son variant (4,12) obtenu par Iseki [8] après culture dans un milieu synthétique additionné de sérum anti 5.

POLYOSIDES. — Les polyosides ont été extraits par hydrolyse acétique (N/10) des germes (cultivés sur gélose nutritive, lavés et séchés par l'acétone) et purifiés selon la technique de Freeman [4] puis dialysés et lyophilisés [18].

Le polyoside extrait de la souche sauvage (4,5,12) a été appelé I⁵, celui extrait du mutant (4,12) a été appelé I.

SÉRUMS. — Un sérum n°1 de cheval anti *S. paratyphi* B (4,5,12) préparé par immunisation d'un cheval suivant le protocole habituel [17] au moyen d'une suspension des germes de *S. paratyphi* B (4,5,12), tués par chauffage à 100°.

Le même sérum de cheval précipité par le polyoside I (4,12), et ne contenant donc plus d'anticorps 4,12 précipitants, a été appelé sérum 1 bis : il contenait des anticorps précipitants anti 5.

Un sérum de lapin n° 2 était constitué par les sérums mélangés de 8 lapins immunisés par des germes tués par chauffage à 100° de la souche glasgow de *S. typhi murium* (4,5,12).

Le même sérum de lapin précipité par le polyoside I (4,12), ne contenant donc plus que des anticorps précipitants anti 5, a été appelé sérum 2 bis.

Un sérum de cheval n° 3 préparé par injection, à un cheval, de germes tués par la chaleur d'une souche de *S. typhi murium*, provenant du Centre des *Salmonella* de l'Institut Pasteur et ne contenant que des antigènes 4 et 12. Ce sérum ne contenait donc pas d'anticorps anti 5.

Le sérum de cheval anti *S. typhi* n° 2, utilisé déjà dans une étude antérieure [19].

(1) Les chiffres entre parenthèses représentent les facteurs antigéniques 0 attribués aux germes dans la classification de Kauffmann-White.

° PRÉCIPITATIONS SPÉCIFIQUES DES IMMUNSÉRUMS. -- Pour l'étude quantitative, nous avons suivi la technique classique de Heidelberger et Kendall [7] suivant les détails techniques déjà publiés [46].

Nous avons utilisé 0,5 ml de sérum de lapin et 0,25 ou 0,5 ml de sérum de cheval.

Les inhibitions spécifiques ont été effectuées selon la technique indiquée dans un article précédent [49].

ETUDE CHIMIQUE DES POLYOSIDES. — Les hydrolyses ont été effectuées par H_2SO_4 N et N/2 en ampoules scellées à 100° pendant des temps variables.

Pour détecter les hexosamines on a hydrolysé le polyside par HCl 6 N pendant dix-huit heures à 100°. La nature des hexosamines a été établie par l'identification chromatographique du pentose formé [6] après dégradation par la ninhydrine.

Les groupements O acyls ont été scindés par l'action de l'hydroxylamine en milieu alcalin suivant l'indication de Stern et Shapiro [20]. L'hydroxamate formé était ensuite dosé par la réaction colorée qu'il donne avec le perchlorure de Fe, en utilisant le réactif, légèrement modifié, de Lippman et Tuttle [42], et la lecture était faite avant trente minutes au moyen d'un photolorimètre Jean et Constant à 540 m μ .

Voici la technique exacte que nous avons suivie :

On prépare extemporanément le mélange à volumes égaux d'une solution 2 M de chlorhydrate d'hydroxylamine et d'une solution 3,5 M de NaOH.

On fait réagir 1 ml de cette solution avec 1 ml de la solution à doser contenant quelques μmol . d'acétyls. On attend une minute à la température du laboratoire et on ajoute 1 ml de la solution constituée par le mélange à parties égales des trois solutions suivantes :

Cl_3Fe	7,5 p. 100
HCl	4,5 M
CCl_3COOH	18 p. 100

Pour déterminer la nature des groupements O acyls, nous avons utilisé la méthode chromatographique de Fink et Fink [3] que nous avons adaptée aux polysides insolubles dans le méthanol de la manière suivante : 15 mg de polyside sont dissous dans la quantité minimum d'eau. Après avoir effectué la réaction (exactement selon la technique de Fink), on dessèche et on extrait l'hydroxamate formé par le méthanol (trois fois), on évapore le méthanol jusqu'à concentration suffisante pour la chromatographie.

CHROMATOGRAPHIE. — Nous avons utilisé la chromatographie descendante, avec les solvants suivants. Pour les sucres réducteurs et les oligosides, le solvant I : dioxane-alcool isoamylique-eau (1,8 : 3 : 1,2) [papier Arches 310] et le solvant II : pyridine-butanol-eau (5 : 9 : 4) (papier Whatman n° 1).

Pour chromatographier les hydroxamates, nous avons utilisé l'alcool amylique et le mélange butanol-acide acétique-eau (8 : 1 : 1) [papier Whatman n° 1].

Comme *révélateurs*, nous avons utilisé le phtalate d'aniline, le tri-chloracétate d'aniline et la diphénylamine pour les sucres et les oligosides réducteurs, la ninhydrine pour les sucres aminés et une solution saturée de chlorure ferrique dans l'alcool *n*-butylique saturé d'eau, pour les hydroxamates [3].

IONOPHORÈSE. — Nous avons suivi la technique classique : papier Whatman n° 3 en tampon borate pH 10 sous 900 volts pendant trois à quatre heures [3 bis].

ÉTUDE DES OLIGOSIDES. — Ils ont été obtenus en éluant par l'eau distillée les hydrolysats de polyosides chromatographiés sur papier Arches 310, avec le solvant I. Pour le dosage des groupements O acétyls, il a été nécessaire d'utiliser des feuilles de papier lavées à l'eau distillée et, après chromatographie, de laver le chromatogramme trois fois par l'éther anhydre afin d'éliminer les substances présentes dans le papier et le solvant, qui perturbaient le dosage.

Nous avons aussi élué par l'eau les oligosides séparés par ionophorèse. Les ions sodium étaient alors éliminés par adsorption sur résine Amberlite IR 120 (H) et les ions borate par additions de méthanol suivies de la distillation de l'ester méthylborique [23].

L'étude de ces oligosides a été entreprise au moyen des techniques déjà décrites par Tinelli et Staub [22].

1° Hydrolyse totale.

2° Hydrolyse partielle.

3° Hydrolyses enzymatiques.

4° Réduction, par le borohydrure de potassium, du sucre réducteur.

5° Dosages comparatifs des sucres après hydrolyse totale des oligosides réducteurs et réduits.

RÉSULTATS.

I. — ÉTUDE DES POLYOSIDES I ET I⁵.

A partir de 210 g de germes secs du mutant (4,12) nous avons obtenu 3,5 g de polyoside I (rendement 1,65 p. 100). A partir de 220 g de germes secs de la souche sauvage (4,5,12) nous avons obtenu 3,52 g de polyoside I⁵ (4,5,12) [rendement 1,57 p. 100].

1° Etude immunologique.

a) *Détection des différents facteurs O du tableau de Kauffmann-White présents sur les polyosides I et I⁵.*

Les deux polyosides précipitent un sérum anti-*S. typhi* (9,12) : ils contiennent donc tous deux le facteur 12.

Les deux polyosides précipitent à peu près la même quantité d'anticorps du sérum n° 3 qui contient des anticorps 4 et peu

d'anticorps 12 (fig. 1). Ils contiennent donc tous deux les motifs antigéniques responsables de la spécificité 4.

Le polyoside I⁵ précipite plus d'anticorps que le polyoside I des sérums de cheval n° 1 et de lapin n° 2 qui contiennent les anticorps 4,5,12 (fig. 2 et 3). D'autre part, les courbes C des mêmes figures 2 et 3 montrent que 80 µg d'azote d'anticorps 5 sont précipitables par le polyoside I⁵ de 0,5 ml de sérum de cheval

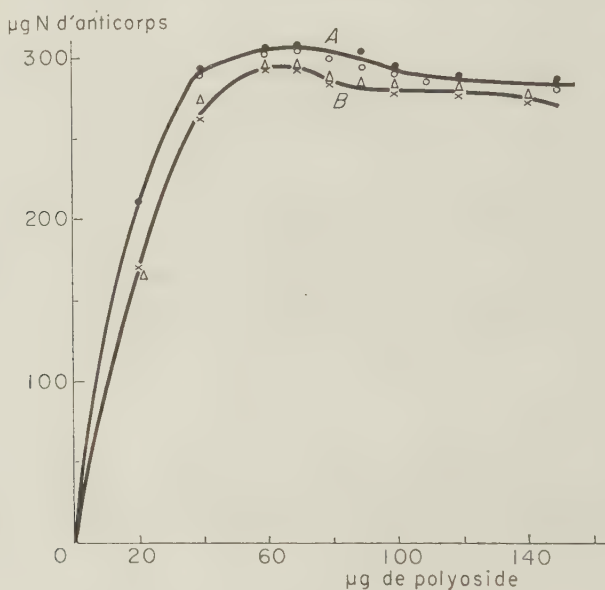


FIG. 1. — Courbes de précipitation obtenues avec le sérum de cheval n° 3 contenant les anticorps 4 et 12, et les polyosides I et I⁵ intacts et dégradés par la soude.

A : courbe de précipitation obtenue avec le polyoside I (● intact, ○ dégradé).

B : courbe de précipitation obtenue avec le polyoside I⁵ (Δ intact, × dégradé).

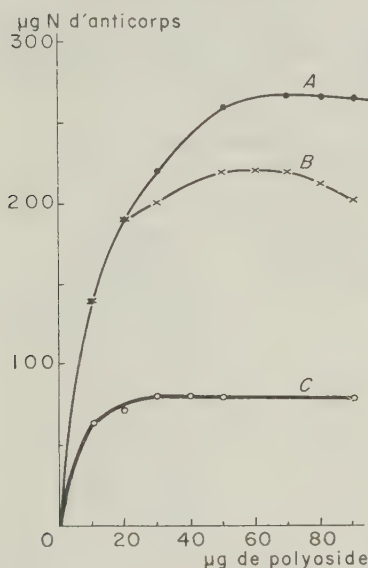
épuisé par le polyoside I (150 µg de polyoside pour 1 ml de sérum) donc ne précipitant plus avec lui, et 126 µg d'azote d'anticorps sont précipitables de 0,5 ml de sérum de lapin épuisé par le polyoside I (200 µg de polyoside pour 1 ml de sérum), donc ne précipitant plus avec lui.

Il est donc certain que notre préparation de polyoside I⁵ contient le facteur 5.

b) Le facteur 5 présent dans le polyoside I⁵ est-il porté par une molécule distincte ou par la même molécule que les facteurs 4 et 12 ? Pour cette étude, nous avons utilisé exactement la tech-

nique préconisée par Meyer [14] et reprise par Stocker et ses collaborateurs dans l'étude du facteur 1 [21].

Nous avons précipité 40 μg de polyoside I⁵ par 2 ml de sérum n° 3 ne contenant que des anticorps 4 et 12, nous plaçant ainsi dans la zone d'excès d'anticorps ; après trois lavages en solution physiologique (NaCl, 0,9 p. 100) le précipité a été mis en suspension dans la même solution et chauffé à 100° pendant cinq minutes. Le polyoside ainsi extrait précipitait le sérum n° 1 bis qui ne contient pas d'anticorps 4



← FIG. 2.

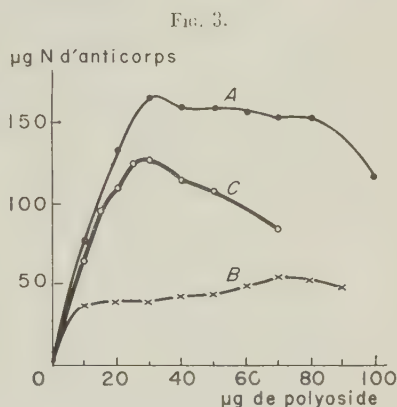


FIG. 3.

FIG. 2. — Courbes de précipitation obtenues avec le sérum de cheval n° 1 contenant les anticorps 4, 5, et 12.

A : courbe obtenue avec le polyoside I⁵. B : courbe obtenue avec le polyoside I. C : courbe obtenue avec le sérum épuisé par I (donc ne contenant plus que des anticorps 5) et le polyoside I⁵.

FIG. 3. — Courbes de précipitation obtenues avec le sérum de lapin n° 2 contenant les anticorps 4, 5, et 12.

A : courbe obtenue avec le polyoside I⁵. B : courbe obtenue avec le polyoside I. C : courbe du sérum n° 2 bis épuisé par I (donc ne contenant plus que les anticorps 5) avec I⁵.

et 12 mais seulement des anticorps 5 absents du sérum n° 3 (qui avait précipité le polyoside). Un contrôle avec un sérum normal de cheval est resté négatif.

Cette expérience (n° 1 du tableau I) démontre donc que le facteur 5 est bien porté par le même polyoside que les facteurs 4 et 12.

Une expérience parallèle (n° 2 du tableau I) a confirmé ce premier résultat. Nous avons, cette fois, précipité le polyoside I⁵ par un excès d'anticorps 5 (sérum n° 1 bis) et nous avons vérifié que le polyoside extrait du précipité suivant le même protocole que dans l'expérience précédente précipitait le sérum n° 3 ne contenant que les anticorps 4 et 12.

Enfin pour nous assurer qu'il ne s'agissait pas d'une absorption non spécifique d'un polyoside différent sur le précipité spécifique, nous avons recommencé la deuxième expérience en présence d'un polyoside ne contenant pas le facteur 5 (expérience 3 du tableau I), le polyoside extrait de *S. senftenberg* contenant les facteurs 1, 3, 19. Puis, nous avons recherché si le

TABLÉAU I. — Position des facteurs 5 sur la même molécule que les facteurs 4 et 12.

EXPÉRIENCE N°	POLYOSIDE	ANTICORPS PRÉCIPITANTS	ANTICORPS PRÉCIPITÉS PAR LE POLYOSIDE EXTRAIT DU PRÉCIPITÉ
1	I ⁵ (1)	4, 12 (3)	5 (4) + sérum normal —
2	I ⁵	5	4, 12 + sérum normal —
3	I ⁵ + S (2)	5	4, 12 + sérum normal — 1 (anti S) —
4	I ⁵	5	9, 12 + sérum normal —
5	I ⁵	9, 12 (5)	5 + sérum normal —

(1) I⁵ = polyoside extrait de la souche contenant les facteurs 4, 5 et 12. (2) S = polyoside extrait d'une souche de *S. senftenberg* contenant les facteurs 1, 3, 19. (3) Sérum de cheval n° 3 préparé avec une souche de *S. typhi murium* ne contenant que les facteurs 4 et 12. (4) Sérum de lapin n° 2 épuisé par le polyoside I ne contenant que les anticorps 5. (5) Sérum anti-*S. typhi* contenant les anticorps 9 et 12.

polyoside extrait du précipité spécifique, obtenu avec les anticorps 5, précipitait un sérum contenant des anticorps 1 et ne précipitant pas avec I⁵ et I. Nous n'avons observé aucune précipitation.

Des expériences semblables effectuées avec les anticorps 5 et 12 montrèrent que le facteur 5 est porté sur la même molécule que le facteur 12 (tableau I, expériences nos 4 et 5).

c) Action d'une solution alcaline sur l'activité immunologique des polyosides I et I⁵. De nombreux auteurs [2, 5, 15] ont noté

l'extrême labilité du facteur 5 en milieu alcalin. Nous inspirant des résultats obtenus par Furth et Landsteiner [5], nous avons laissé pendant des temps variables le polyoside I⁵ dans une solution de soude 0,01 N à la température du laboratoire, puis nous avons étudié l'action immunologique de ces solutions convenablement neutralisées et salifiées (NaCl 0,9 p. 100). La figure 4 montre qu'au cours des cinq premières minutes, le polyoside précipite de moins en moins d'anticorps 5 du sérum n° 2 bis, ne contenant que les anticorps 5. Après cinq minutes, il a perdu tout pouvoir précipitant vis-à-vis des anticorps 5, toutefois il est encore capable d'inhiber la précipitation de ces anticorps par le polyoside non soumis au traitement alcalin. Cette pro-

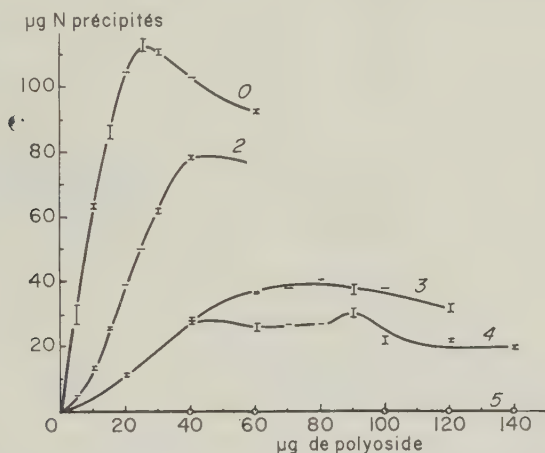


FIG. 4. — Précipitation des anticorps 5 par le polyoside I⁵ après différents temps d'hydrolyse alcaline.

0, 2, 3, 4, 5 : minutes pendant lesquelles le polyoside I⁵ a été laissé en solution dans la soude 0,01 N à la température du laboratoire.

priété diminue peu à peu dans les minutes suivantes ; elle a complètement disparu après soixante minutes (2) (tableau II).

La destruction des propriétés immunologiques se limite exclusivement au facteur 5. La figure 1 montre en effet que la précipitation des anticorps 4 et 12 du sérum n° 3 par les deux polyosides I et I⁵ n'est absolument pas modifiée après séjour

(2) Ces résultats ne sont valables que si l'on utilise 1 mg de polyoside ; avec des quantités plus fortes (10 mg ou plus), on peut encore obtenir une inhibition significative, mais les mêmes quantités de polyoside I sans facteur 5 donnent des résultats très semblables.

TABLEAU II. — Disparition simultanée des propriétés immunologiques du facteur 5 et des groupements O acétyls au cours de la dégradation du polyoside I⁵ par NaOH 0,01 N.

TEMPS DE DÉGRADATION EN MINUTES (1)	μMOL. O ACÉTYL PAR mg DE POLYOSIDE	MAXIMUM D'AZOTE PRÉCIPITÉ DE 0,5 ml DE SÉRUM EN μg (2)	% D'INHIBITION (1 mg) (3)
0	1,45	113	—
2	0,77	79	—
3	0,59	40	—
4	0,45	30	—
5	0,41	0	88
15	0,10	—	40
30	0,09	—	19
45	0,06	—	5
60	0,06	—	0
Polyoside 1	0,06	0	0

(1) A la température du laboratoire. (2) Sérum ne contenant que des anticorps anti-5. (3) Inhibition de la précipitation des anticorps anti-5 par le polyoside I⁵.

de ces polyosides pendant une heure dans la solution NaOH 0,01 N à la température du laboratoire.

De même la précipitation d'un sérum anti *S. typhi* par le polyoside I⁵ dégradé montre que le facteur 12 n'est pas détruit par la soude dans ces conditions.

d) *Inhibition des anticorps 5 par les sucres simples.* Le tableau III résume les résultats de cette étude : on voit qu'à des concentrations élevées (40 mg) les glucose, galactose, mannose et rhamnose, présents dans le polyoside I⁵, inhibent la précipitation des anticorps 5 par I⁵ (l'abéquose est sans effet, mais il n'a pu être essayé qu'à la dose de 4 mg, faute de quantités suffisantes). Toutefois, le galactose est le plus actif. A des doses plus faibles, tous ces sucres sont sans effet, ainsi d'ailleurs que les N acétyl-glucosamine et mannosamine : par contre la N acétyl-galactosamine est assez fortement inhibitrice : or, ce sucre n'existe pas dans le polyoside (Cf. ci-dessous).

2° Etude chimique.

L'analyse élémentaire des deux polyosides a fourni des résultats pratiquement identiques (tableau IV).

L'hydrolyse des deux polyosides par H₂SO₄ N à 100° fait apparaître d'abord de l'abéquose, puis du glucose (en faible quantité),

TABLEAU III. — Inhibition de la précipitation des anticorps anti-5 par les sucres simples et les hydrolysats des polysides I et I⁵.

INHIBITEUR		% D'INHIBITION OBSERVÉ AVEC	
Sucres simples			
Nature du sucre	Quantités utilisées		
	40 mg	4 mg	
Glucose	16	0	
Galactose	24	0	
Mannose	14	0	
Rhamnose	14	0	
Abéquose	—	0	
Glucosamine	16	0	
N-acétyl-glucosamine	—	0 (7,8) (*)	
N-acétyl-galactosamine	—	18 (7,5)	
N-acétyl-mannosamine	—	0 (2,7)	
Hydrolysats par SO ₄ H ₂ N à 100°			
Polyoside *	Temps d'hydrolyse (minutes)	Quantités de polyoside hydrolysées	
		10 mg	5 mg
I	5	0	—
I ⁵	15	0	—
I ⁵ (total)	5	74	58
I ⁵ (fraction dialysable)	5	—	31
I ⁵ (fraction non dialysable)	5	—	14

* Les chiffres entre parenthèses indiquent les quantités (en milligrammes) utilisées pour chacun de ces trois sucres.

du galactose, du mannose et du rhamnose. Après vingt-quatre heures, il reste encore quelques oligosides réducteurs contenant une hexosamine. L'hydrolyse par HCl 6N pendant dix-huit heures, à 100°, détruit complètement ces oligosides et libère une hexosamine qui, dans les deux polyosides, produit de l'arabinose après réduction par la ninhydrine. Il ne s'agit donc sûrement pas de galactosamine. Nous n'avons pas cherché à savoir s'il s'agissait de glucosamine ou de mannosamine.

TABLEAU IV. — Constitution chimique des polyosides I et I⁵.

	POLYOSIDES			
	I		I ⁵	
Rendement de la réparation	1,65 %		1,57 %	
Analyse élémentaire {	C	40,38 %	40,29 %	
	H	7,11 %	7,07 %	
	N	0,4 %	0,35 %	
	P	0,66 %	0,84 %	
Cendres	2,81 %		2,71 %	
Sucres constitutifs	(glucose) (1) galactose mannose rhamnose abéquose glucosamine (ou mannosamine)		(glucose) galactose mannose rhamnose abéquose glucosamine (ou mannosamine)	
μmol de O acétyls dans 1 mg de polyoside ..	INTACT	DÉGRADÉ (2)	INTACT	DÉGRADÉ
	0,09 (3)	0,09	1,45	0,06 (3)

(1) L'intensité des taches sur les chromatogrammes montre que le glucose est présent en quantité beaucoup moindre que les autres sucres. (2) Dégradé : par action d'une solution 0,01 N de NaOH pendant une heure à la température du laboratoire.

(3) Valeurs non significatives dans ce dosage.

L'extrême labilité du facteur 5 en milieu alcalin nous a fait soupçonner la présence de groupements O acyls beaucoup plus labiles que les groupements N acyls. Nous avons donc dosé ces groupements dans les polyosides I et I⁵ soumis ou non, pendant une heure, à l'action d'une solution 0,01 N de NaOH à la température du laboratoire. Seul le polyoside I⁵ contient des groupements O acyls (1,45 μmol. calculés en acétyls, pour 1 mg de polyoside, soit environ 1 groupement O acyl pour 4 ou 5 molécules de sucres) et ces groupements sont bien détruits au moment où nous avons constaté la disparition de toute activité immunologique.

Une étude plus précise de la disparition des groupements O acyls au cours du temps montra un remarquable parallélisme

entre la présence de ces groupements et l'activité immunologique du polyoside I⁵ (tableau II).

L'acide en cause dans l'ester présent sur I⁵ est l'acide acétique. En effet, l'hydroxamate formé après action de l'hydroxylamine sur le polyoside I⁵ migre en chromatographie exactement comme l'hydroxamate d'acétyl (pl. I); or, on connaît la grande spécificité des vitesses de migration en chromatographie des hydroxamates de formyl, d'acétyl et de propionyl dont les R_f, dans l'alcool amylique par exemple, sont respectivement 0,12; 0,35 et 0,56 [3].

La présence des groupements O acétyls dans le polyoside I⁵ et leur absence dans le polyoside I ont été confirmées par les spectres I.R. de ces deux polyosides.

II. — ÉTUDE DES OLIGOSIDES.

1° Détection et obtention des oligosides immunologiquement actifs présents dans les hydrolysats du polyoside I⁵.

Conformément à la méthode suivie pour l'analyse des facteurs 1 [21] et 12 [22], nous avons recherché le pouvoir inhibiteur des hydrolysats du polyoside I⁵ après divers temps d'hydrolyse par H₂SO₄ N à 100°. On voit sur le tableau III que l'hydrolysate de cinq minutes est fortement actif, contrairement à l'hydrolysate de I obtenu dans les mêmes conditions. Celui de dix minutes a déjà perdu son activité. L'étude respective des fractions dialysable ou non de l'hydrolysate de cinq minutes a montré qu'elles étaient toutes deux actives : il existe donc, dans cet hydrolysate, et non dans celui de polyoside I, un (ou des) oligoside contenant au moins une partie du groupement chimique responsable de la spécificité du facteur 5.

Nous avons cherché ensuite à localiser sur les chromatogrammes des hydrolysats du polyoside I⁵ les oligosides inhibiteurs absents des hydrolysats du polyoside I. La planche II montre qu'il est impossible de déceler la moindre différence entre les chromatogrammes obtenus avec les hydrolysats de I⁵ et de I obtenus dans les mêmes conditions.

Par contre, l'étude des inhibitions obtenues avec chacun des 6 oligosides (1 à 6) élués des chromatogrammes des hydrolysats de cinq minutes nous a montré que, en dehors des oligosides 1, qui sont difficilement séparables de la fraction immobile, les oligosides 2 et 3 séparés des hydrolysats de I⁵ donnaient de bonnes inhibitions, alors que les mêmes oligosides provenant de I étaient inactifs.

Nous avons donc séparé les oligosides I₂ et I₃ provenant de l'hydrolysate de 400 mg de polyoside I⁵. Toutefois, avec ces grandes quantités, l'activité des oligosides séparés était très

inconstante. Afin d'éviter de dégrader la fraction active des oligosides, nous avons utilisé un acide moins concentré (H_2SO_4 N/2) qui fournissait des oligosides de même R_G que ceux obtenus avec l'acide N. Bien que, dans ces conditions, les quantités d'oligosides libérés soient beaucoup plus faibles, leur activité inhibitrice est plus constante, voisine de 35 p. 100 pour les oligosides extraits de 10 mg de polyoside.

Après avoir isolé les oligosides I_2 et I_3^5 , I_3 et I_3^5 provenant de l'hydrolyse de 400 mg de polyoside I et de 400 mg de polyoside I^5 , nous avons constaté que seuls les deux oligosides I_2 et I_3 semblaient homogènes tant en chromatographie dans les solvants I et II qu'en ionophorèse (pl. III).

TABLEAU V. — Composition et propriétés immunologiques de quelques oligosides séparés des hydrolysats de 10 mg de polyoside.

	POLYOSIDE I^5		POLYOSIDE I	
	Oligosides		Oligosides	
	I_2^5	I_3^5	I_2	I_3
<i>Nombre de taches :</i>				
dans le solvant I....	I	I	I	I
— III ..	I	2 ?	I	2 ?
en ionophorèse	I	3	I	2
Pouvoir inhibiteur	33-40 % (1)	32-38 % (1)	0	0
Groupements O acétyls..	+	+	—	—
Sucres constitutifs	mannose 2 galactose 2 rhamnose 2	/ (4)	mannose 2 galactose 2 rhamnose 2	/
Sucre terminal réducteur (2)	rhamnose	/	rhamnose	/
Sucre terminal non réducteur (3)	galactose	/	galactose	/

(1) Résultats obtenus avec deux préparations différentes. (2) Sucre terminal réducteur déterminé après réduction par le borohydrure de K. (3) Déterminé au moyen de l'attaque par un mélange d' α - et de β -galactosidases et par l'hydrolyse ménagée.

(4) / pas fait.

L'oligoside I_3^5 se dédouble après chromatographie dans le solvant II, mais les deux taches sont trop proches, dans les conditions où nous avons travaillé, pour être séparables. Trois taches se séparent nettement après ionophorèse de I_3^5 provenant du polyoside I^5 et deux taches seulement après ionophorèse de I_3 provenant du polyoside I (pl. III). Malheureusement, les oligo-

sides de I_3^5 , isolés par élution après ionophorèse, étaient immunologiquement inactifs. Par contre, comme nous l'avons vu, les oligosides I_2 et I_2^5 semblent homogènes. Nous nous sommes donc attachées à l'étude de ces deux oligosides.

2° Analyse des oligosides I_2^5 et I_2 .

Nous disposions de quantités de ces oligosides bien trop faibles pour pouvoir les purifier et en aborder une étude chimique détaillée. Nous avons néanmoins essayé d'obtenir quelques renseignements qualitatifs sur leur composition : ils sont groupés sur le tableau V.

L'hydrolyse totale (3 heures H_2SO_4 N à 100°) a fourni trois sucres : galactose, mannose et rhamnose en quantités égales.

La réduction par le borohydrure de K nous a permis de cons-

TABLEAU VI. — Pouvoir inhibiteur et teneur en groupement O acétyls des oligosides immunologiquement actifs isolés de I^5 et des oligosides inactifs isolés de I.

	% d'inhibition	μ mol. de O acétyl (2)
I^5 { 2	36	0,54
2 dégradé (1)	0	0,09
I^5 { 3	35,5	0,66
3 dégradé	0	0,13
I { 2	0	0,2
2 dégradé	0	0,2
I { 3	0	0,2
3 dégradé	0	0,2

(1) Dégradé par action d'une solution 0,01 N de NaOH pendant une heure à la température du laboratoire. (2) Dosage effectué sur la quantité d'oligoside provenant de l'hydrolysate de 60 mg de polyside.

tater que, seul, le rhamnose était réducteur et que la moitié seulement était réduite par le borohydrure, aussi bien dans I_2^5 que dans I_2 . La proportion de sucres après réduction devenant 2 galactoses, 2 mannoses, 1 rhamnose, les oligosides I_2 et I_2^5 semblent être des hexaosides contenant 2 galactoses, 2 mannoses et 2 rhamnoses.

Nous avons effectué des hydrolyses ménagées sur les oligosides I_2 et I^5 pendant des temps variés (cinq, dix, quinze, trente minutes) par H_2SO_4 N à 100° et ensuite par H_2SO_4 N/2 et N/5 pendant

cinq minutes à 100°. Les résultats obtenus par la chromatographie des hydrolysats nous ont montré que le premier sucre libéré (après hydrolyse par H_2SO_4 N/2 à 100° pendant cinq minutes) était le galactose.

Pour confirmer ce dernier résultat, nous avons essayé d'effectuer une *hydrolyse enzymatique* à l'aide d'une préparation non purifiée d' α -galactosidase extraite de graines de café, préparation qui contenait aussi une β -galactosidase. Les quantités d'oligoside I_2 dont nous disposions étant très faibles, nous avons pu simplement constater, après huit heures d'hydrolyse, sur le chromatogramme, révélé par le phtalate d'aniline, l'apparition d'une tache visible en lumière ultraviolette, migrant exactement comme le galactose.

Enfin, nous avons recherché la présence des *groupements O acétyls* sur les oligosides extraits de I^5 et de I. On voit sur le tableau VI que seuls les oligosides extraits de I^5 possèdent des groupements O acétyls (3) et que, comme pour le polyoside, l'activité immunologique disparaît lorsqu'on scinde ces groupements par action d'une solution sodique 0,01 N pendant une heure à la température du laboratoire.

DISCUSSION.

Nous avons abordé l'étude du facteur 5 des *Salmonella* du groupe B en utilisant une souche de *S. typhi murium* contenant les facteurs 4, 5 et 12 et son mutant isolé par Iseki [8] ne contenant que les facteurs 4 et 12.

Les polyosides extraits des germes, provenant de ces deux souches, par la technique de Freeman [4] précipitaient un sérum de lapin contenant des anticorps 4, 5 et 12, préparé en injectant aux animaux une suspension de germes tués de la souche sau-

(3) Les nombres du tableau sont très relatifs, ils indiquent seulement l'absence ou la présence de groupements O acétyls. En effet, bien que nous ayons effectué les dosages sur les quantités d'oligosides I_2^5 et I_2 fournissant la même quantité de chacun de leurs sucres constitutifs après hydrolyse, les dosages utilisés pour les sucres (intensité des taches par rapport à un étalon) manquent trop de précision pour donner des résultats rigoureux.

PLANCHE I

Identification du groupement O acyl présent sur le polyoside I^5 à un groupement O acétyl.

Chromatogramme des hydroxamates obtenus après action de l'hydroxylamine sur les polyosides I et I^5 (solvant butanol-acide acétique-eau 8 : 1 : 1). T : hydroxamate d'acétyl.



PLANCHE I.

MASSON ET C^{ie}, ÉDITEURS

PLANCHÉ II

Oligosides libérés de I et I⁵ après cinq, dix et quinze minutes d'hydrolyse par
 H_2SO_4 N à 100°.

T : galactose et glucose témoins. A. : I⁵ hydrolysé quinze minutes. B. I hydrolysé quinze minutes. C : I⁵ hydrolysé dix minutes. D : I hydrolysé dix minutes. E : I⁵ hydrolysé cinq minutes. F : I hydrolysé cinq minutes. 1,2 ... 6 : numéros des oligosides.

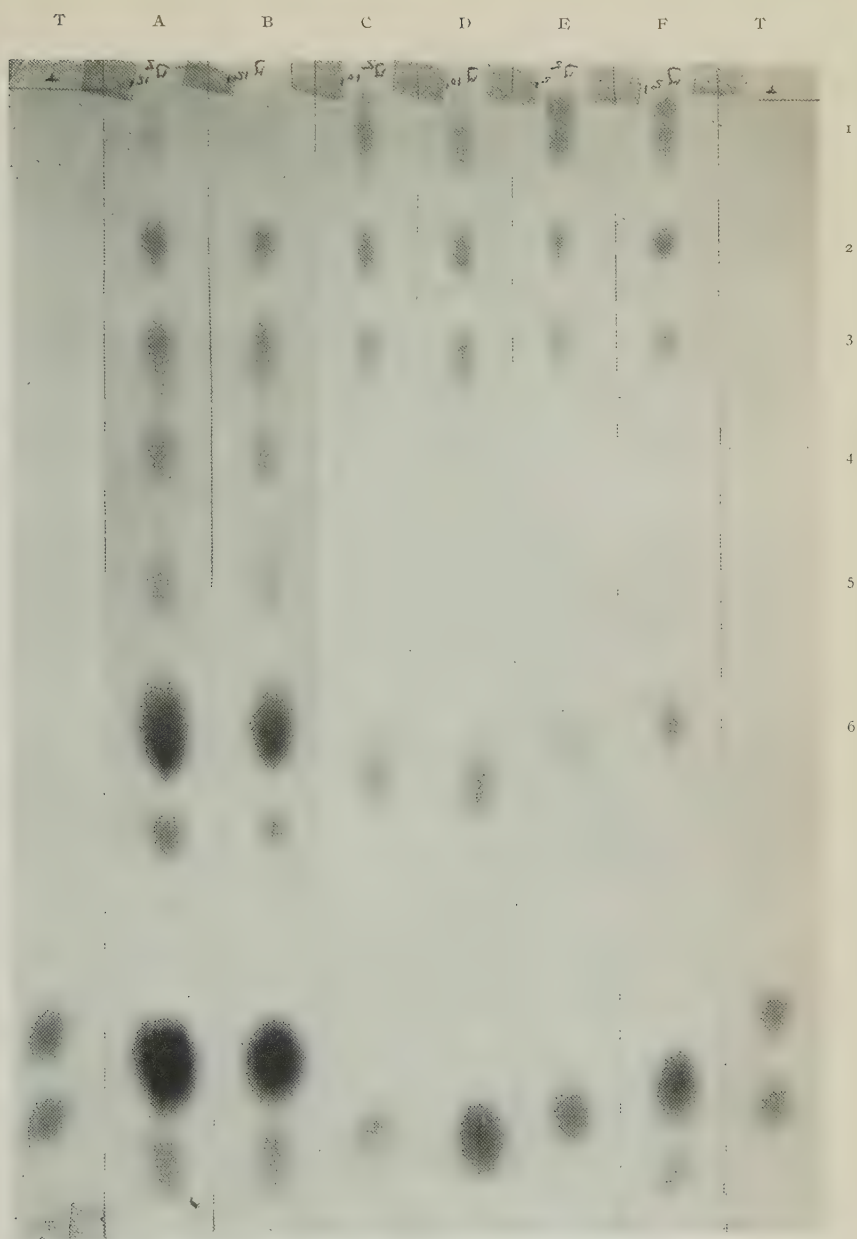


PLANCHE II.

MASSON ET C^{ie}, ÉDITEURS

PLANCHÉ III

Comportement en ionophorèse des oligosides I_2 et I_2^v , I_3 et I_3^v .

La ligne de départ est à la limite exacte de la photographie. T : glucose I_3^v , I_3 , I_2 , I_2^v oligosides (Cf. texte). A I_3^v on a ajouté du glucose.

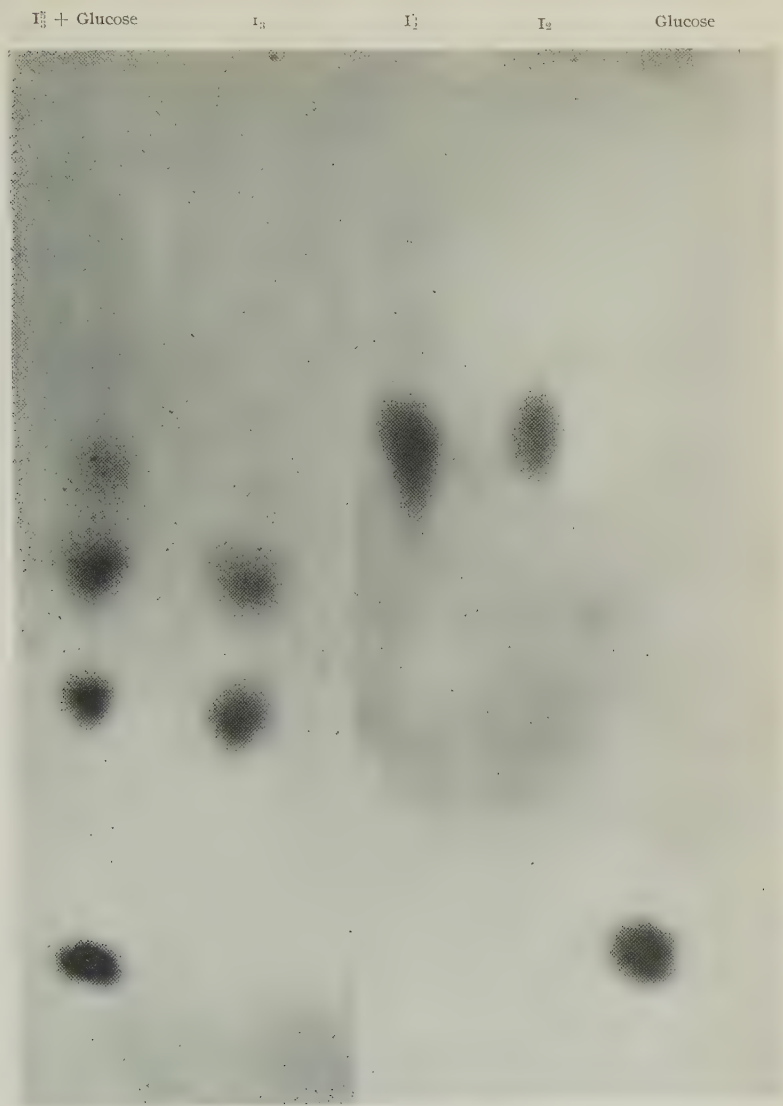


PLANCHE III.

MASSON ET C^{ie}, ÉDITEURS

vage, un sérum de cheval contenant les mêmes anticorps, préparé en injectant à l'animal une suspension de *S. paratyphi* B (1, 4, 5, 12) et un sérum de cheval ne contenant que les anticorps 4 et 12, préparé par immunisation avec une souche de *S. typhi murium* du Centre de l'Institut Pasteur, ne contenant que les antigènes 4 et 12.

Par contre, seul le polyoside I⁵ extrait de la souche sauvage (4, 5, 12) précipitait les deux premiers sérums saturés par le polyoside I, extrait du mutant (4, 12), qui ne contenaient donc plus que les anticorps 5. Ces sérums saturés nous ont servi à étudier la précipitation des anticorps 5 et leur inhibition. Si le sérum de cheval n° 1 était beaucoup plus riche que le sérum de lapin (220 µg contre 56 µg N par ml) en anticorps 4, 12, il était par contre beaucoup plus pauvre en anticorps 5 (80 µg N/ml contre 126 µg N/ml).

Cette différence entre les sérums peut n'être que fortuite, mais il se peut aussi que les lapins qui ne possèdent pas d'antigène Forssman aient plus de facilité à produire des anticorps 5 que les chevaux qui possèdent cet antigène. On sait, en effet, que cet antigène présente une certaine parenté immunologique avec le facteur 5 [15].

La précipitation par le polyoside I⁵ des sérums ne contenant plus que des anticorps anti 5 signait la présence du facteur 5 sur ce polyoside. Ceci confirme les observations d'autres auteurs [5, 14] travaillant avec d'autres préparations de polyosides. Nous avons pu montrer que ce facteur était présent sur la même molécule que les deux autres facteurs confirmant ainsi par des techniques différentes les résultats de Lüderitz et de ses collaborateurs [13]. Il semble donc bien qu'on ne puisse plus parler d'un antigène spécial pour le facteur 5, comme certains l'avaient pensé [2, 10], mais qu'il s'agisse simplement d'un groupement spécifique présent sur le polyoside somatique des *Salmonella* du groupe B.

Nous avons, d'autre part, confirmé l'extrême labilité de ce facteur en milieu alcalin, puisqu'un séjour de cinq minutes dans la soude 0,01 N à la température du laboratoire détruisait tout pouvoir précipitant du polyoside I⁵ vis-à-vis des sérums saturés ne contenant plus que les anticorps 5. Ce même traitement laissait par contre inchangé le pouvoir précipitant du même polyoside vis-à-vis du sérum n° 3 ne contenant que les anticorps 4 et 12 ainsi d'ailleurs que le pouvoir précipitant du polyoside I (4, 12) vis-à-vis de ce même sérum.

Nous avons alors espéré pouvoir isoler des hydrolysats partiels du polyoside I⁵ un (ou des) oligoside(s) absent (s) des hydrolysats du polyoside I, comme cela avait été possible pour les oligosides responsables de la spécificité du facteur 1 [21].

Contrairement à ce qui s'était passé pour le facteur 1, nous n'avons pu déceler dans les chromatogrammes du polyoside I⁵ hydrolysé cinq minutes par H₂SO₄ N/2, aucune tache différente de celles présentes dans les chromatogrammes du polyoside I hydrolysé dans les mêmes conditions. Toutefois, l'étude systématique des inhibitions des anticorps 5 par les différents oligosides (ou groupes d'oligosides) révéla que certains de ceux présents dans l'hydrolysate de I⁵ (I₂⁵ et I₃⁵) étaient inhibiteurs, alors qu'aucun de ceux extraits de I, en particulier I₂ et I₃, ne présentait la moindre activité.

Une étude plus approfondie de deux oligosides I₂⁵ et I₃⁵ montra bien une différence en ionophorèse : I₃⁵ contenait deux oligosides, alors que I₂⁵ en contenait trois. Malheureusement, il fut impossible d'éluer l'oligoside propre à I⁵ sans perdre son activité immunologique.

Deux autres oligosides I₂¹ et I₂² ont retenu notre attention car ils semblaient homogènes aussi bien en chromatographie qu'en ionophorèse. Nous nous sommes donc attachées à leur étude préliminaire (4).

Les deux oligosides contiennent les six mêmes sucres et dans les mêmes proportions :

galactose, mannose rhamnose (2, 2, 2).

Ils possèdent tous deux un rhamnose terminal réducteur (déterminé par le borohydrure de K) et vraisemblablement un galactose terminal non réducteur (déterminé par l'hydrolyse ménagée et l'action d'une galactosidase). Toutefois, l'un (I₂¹) inhibe la précipitation des anticorps 5 et l'autre (I₂²) ne l'inhibe pas. Comme pour le polyoside, un séjour de soixante minutes dans NaOH 0,01 N à la température du laboratoire supprime l'activité immunologique de I₂¹. Il en est de même d'ailleurs pour I₂².

L'extrême labilité en milieu alcalin du facteur 5 sur le polyoside ou les oligosides, inclinait à penser à la présence d'un groupement O acyl responsable de la spécificité immunologique. On pourrait comprendre alors les comportements identiques de I₂¹ et I₂² en chromatographie et en ionophorèse, la présence de ce seul groupement sur un hexaoside pouvant ne modifier que d'une façon imperceptible leurs propriétés décelables par ces techniques. Par contre, la présence du même groupement sur I₃¹ dont le poids moléculaire est vraisemblablement plus petit, expliquerait l'existence d'un oligoside migrant un peu plus lentement que I₃ en ionophorèse.

(4) L'isolement de quantités plus importantes de ces oligosides est en cours. Ceci permettra d'en aborder une étude chimique approfondie.

Nous avons donc recherché l'existence de tels groupements au moyen de l'hydroxylaminolyse [20] aussi bien dans les deux polyosides que dans les oligosides. Nous avons constaté en effet, la présence d'un grand nombre de groupements O acétyls sur le polyoside I⁵ et les oligosides qui en dérivent et leur absence dans le polyoside I et les oligosides qui en proviennent. De plus, il y a un parallélisme étroit entre la disparition de ces groupements O acétyls et celle des activités immunologiques (précipitation des anticorps 5 par le polyoside, inhibition des mêmes anticorps par les oligosides).

On est donc en droit de supposer que la spécificité du facteur 5 serait rattachée à la présence sur le polyoside d'un oligoside terminal.

O acétyl-galactose, (.....) rhamnose.

Ceci expliquerait le fait paradoxal que, parmi les sucres simples essayés, le meilleur inhibiteur de la précipitation des anticorps 5 par I⁵ est la N acétyl-galactosamine absente de nos polyosides I⁵ et I. On pourrait, en effet, penser qu'un groupement O acétyl placé en position 2 sur le galactose terminal donne naissance à des anticorps susceptibles d'être inhibés par la N acétyl-galactosamine. Ceci expliquerait aussi la légère inhibition observée avec de fortes quantités de galactose.

Ce nouvel exemple du rôle important des groupements acétyls dans la spécificité des polyosides vient s'ajouter aux résultats antérieurement obtenus avec les polyosides du pneumocoque I [4] et des *Shigella* [15 bis] et tout récemment avec l'antigène Vi [4 bis]. Ce dernier cas rapproche d'une façon inattendue le facteur 5 de l'antigène Vi, comme le voulait Felix pour des raisons très différentes. Cette ressemblance n'est que très partielle d'ailleurs, car on sait que l'antigène Vi est constitué par un polymère d'un acide galacturonique aminé sur lequel seraient fixés les groupements O acétyls [7 bis], alors que, sur le facteur 5, ils sont vraisemblablement fixés sur du galactose. Enfin, le grand nombre de groupements O acétyls présents sur le polyoside I⁵ (1 pour 4 ou 5 sucres) pourrait expliquer l'effet inhibiteur du facteur 5 sur l'agglutination des germes par les anticorps 4 et 12, bien que dans cette étude sur les polyosides isolés nous n'ayons pas constaté cette inhibition : le polyoside I⁵ précipite en effet comme le polyoside I les anticorps 4, 12 du sérum n° 3.

RÉSUMÉ.

Le polyoside somatique spécifique a été extrait d'une souche de *S. typhi murium* contenant les facteurs 4, 5 et 12 (I⁵) et de son mutant ne contenant que les facteurs 4 et 12 (I). L'absorption par

le polyoside I des sérums de lapin et de cheval préparés avec la souche sauvage a permis d'obtenir des anticorps 5 et d'étudier leur inhibition par des sucres simples et par des oligosides isolés de I⁵.

L'activité immunologique du polyoside I⁵ et des oligosides en dérivant s'est trouvée liée à la présence de groupements O acétyls. Enfin, deux oligosides isolés de I et de I⁵ ont été étudiés. Ils se comportent de la même façon en ionophorèse et en chromatographie, et possèdent les mêmes sucres (2 galactoses dont 1 vraisemblablement terminal non réducteur, 2 mannoses, 2 rhamnoses dont 1 terminal réducteur); mais l'oligoside isolé de I⁵, seul capable d'inhiber les anticorps 5, possède en outre un groupement O acétyl responsable de son activité immunologique.

SUMMARY

IMMUNO-CHEMICAL STUDIES ON *Salmonella*.

VIII. ROLL OF O ACETYL GROUPINGS ON THE SPECIFICITY OF FACTOR O : 5.

The somatic polysaccharide was extracted from a strain of *S. typhi murium* bearing the O factors 4,5 and 12 (I⁵) and from its mutant bearing only the factors 4 and 12 (I). Saturation by the polysaccharide I of the rabbit and horse sera prepared with the wild strain (4,5,12) allowed to obtain antibodies 5 and to study their inhibition by simple sugars and oligosaccharides isolated from I⁵.

The immunological specificity of the polysaccharides I⁵, and of the oligosaccharides isolated from it, is linked to the presence of O acetyl groupings. Finally 2 oligosaccharides isolated from I and I⁵, were studied. They behave similarly in ionophoresis and chromatography and possess the same sugars (2 galactoses, one of which is very probably a non reducing terminal, 2 mannoses and 2 rhamnoses one of which is a reducing terminal) but the oligosaccharide isolated from polysaccharide I⁵, the only one which is able to inhibit the antibodies 5, possesses also an O acetyl grouping responsible for its immunological specificity.

★★

Nous remercions le Dr A. Kepes qui nous a appris la technique de dosage des groupements O acyls et le Dr W. Otting qui nous a aidées à réaliser et à interpréter les spectres infra-rouges de nos polyosides. Nous devons au professeur W. T. J. Morgan et au Dr S. Roseman les échantillons de N-acétyl-glucosamine et N-acétyl-galactosamine.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] AVERY (O. T.) et GOEBEL (W. F.). *J. exp. Med.*, 1933, **58**, 731.
- [1 bis] BAKER (E. E.), WHITESIDE (R. E.), BASCH (R.) et DEROW (M. A.). *J. Immunol.*, 1959, **83**, 680. — WHITESIDE (R. E.) et BAKER (E. E.). *J. Immunol.*, 1960, **84**, 221. — LANDY (M.), JOHNSON (A. G.) et WEBSTER (M. E.). *Am. J. Hyg.*, 1961 (sous presse).
- [2] FELIX (A.). *J. Hyg.*, 1952, **50**, 550.
- [3] FINK (K.) et FINK (R. M.). *Proceed. Soc. exp. Biol.*, 1949, **70**, 654.
- [3 bis] FOSTER (A. B.). *Chem. Ind.*, 1952, 1050.
- [4] FREEMAN (G. G.). *Biochem. J.*, 1942, **36**, 340.
- [5] FURTH (J.) et LANDSTEINER (K.). *J. exp. Med.*, 1929, **49**, 727.
- [6] GARDELL (S.), HEJJKENSKJOLD (F.) et ROCHNORLUNG (A.). *Act. Chem. Scand.*, 1950, **4**, 970 ; STOFFYN (P. J.) et JEANLOZ (R.). *Arch. Bioch. Biophys.*, 1954, **52**, 373.
- [7] HEIDELBERGER (M.) et KENDALL (E. F.). *J. exp. Med.*, 1932, **55**, 555.
- [7 bis] HEYNS (K.), KIESSLING (G.), LINDENBERG (W.), PAULSEN (H.) et WEBSTER (M. E.). *Chem. Bericht.* 1959, **92**, 2435.
- [8] ISEKI (S.) et SAKAI (T.). *Proc. Japan. Acad.*, 1952, **28**, 374.
- [9] KAUFFMANN (F.). *Acta path. microb. scand.*, 1947, **24**, 591.
- [10] In KAUFFMANN (F.). *Enterobacteriaceae*, Copenhagen, 1954, p. 47.
- [11] KAUFFMANN (F.), LÜDERITZ (O.), STIERLIN (H.) et WESTPHAL (O.). *Zbl. Bakt. I. Orig.*, 1960, **178**, 442.
- [12] LIPPMANN (F.) et TUTTLE (C.). *J. biol. Chem.*, 1945, **159**, 21.
- [13] LÜDERITZ (O.), O'NEILL (G.) et WESTPHAL (O.). *Bioch. Z.*, 1960, **333**, 136.
- [14] MEYER (K.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1939, **62**, 282.
- [15] MIKULASZEK (E.). *Symposium sur les mucopolysides*. Varsovie, octobre 1959.
- [15 bis] PERLMAN (E.), BINKLEY (F.) et GOEBEL (W. F.). *J. exp. Med.*, 1945, **81**, 349.
- [16] STAUB (A. M.) et COMBES (R.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1951, **80**, 21.
- [17] STAUB (A. M.) et DAVARPANAH (C.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1956, **91**, 338.
- [18] STAUB (A. M.) et TINELLI (R.). *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1957, **39**, Sup. I, 65.
- [19] STAUB (A. M.), TINELLI (R.), LÜDERITZ (O.) et WESTPHAL (O.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1959, **96**, 303.
- [20] STERN et SHAPIRO. *Brit. J. clin. Path.*, 1953, **6**, 158, in COLOWICK (S. P.) et KAPLAN (K. O.). *Methods in enzymology*, Academic Press, 1957, **3**, 323.
- [21] STOCKER (B. A. D.), STAUB (A. M.), TINELLI (R.) et KOPACKA (B.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1960, **98**, 505.
- [22] TINELLI (R.) et STAUB (A. M.). *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1960, **42**, 583.
- [23] ZILL (L. P.), KHYM (J. X.) et CHENIAE (G. M.). *J. Am. chem. Soc.*, 1953, **75**, 1339.

ACTIVITÉ MICROBIOLOGIQUE DES SABLES DE QUELQUES GROUPEMENTS VÉGÉTAUX DU LITTORAL DU PAS-DE-CALAIS

NOTE PRÉLIMINAIRE

par J.-M. GÉHU (*).

*(Laboratoire de Botanique de la Faculté de Médecine
et de Pharmacie, et Institut Pasteur de Lille)*

Parmi les nombreuses formations dunaires qui existent le long de la Manche, de l'estuaire de la Somme au Cap Gris-Nez, les dunes de la région de Wimereux-Ambleteuse (P.-de-C.), sont un cadre idéal pour les recherches phytoécologiques. On y trouve, en effet, sur une surface restreinte (quelques km²), la plupart des associations végétales liées aux sables littoraux, qu'il s'agisse des groupements de la série psammophile ou de ceux de la série hygrophile (Géhu, 1958).

Ce complexe de dunes, situé à mi-distance entre Boulogne-sur-Mer et le Cap Gris-Nez, correspond à deux parties très distinctes :

1° L'une, récente, qui s'est formée depuis plusieurs siècles, sur l'ancien emplacement de l'estuaire de la Slack flamandienne ; les sables y sont toujours mobiles et plus ou moins riches en calcaire.

2° L'autre, plus ancienne, qui correspond, selon Briquet (1930), à des dépôts flamandiens. Les sables y sont généralement fixés et décalcifiés. Plaqués sur les terrains secondaires sous-jacents (kim-méridgien et portlandien), voire même sur du limon, on peut y voir la trace de différents sols végétaux successifs.

LE CLIMAT.

Il est, par excellence, de type nord-atlantique.

La *pluviosité* est de l'ordre de 760 mm par an : six mois relativement secs, de février à juillet, mais où les précipitations ne sont jamais inférieures à 40 mm ; six mois humides, d'août à

(*) Manuscrit reçu le 11 janvier 1961.

janvier, avec fort maximum automnal (octobre : 120 mm).

La *température* moyenne annuelle est de + 10° (minima : 7°4, maxima : 12°6). Moyenne minima du mois le plus froid (janvier) : 1°7, moyenne maxima du mois le plus chaud (août) : 19°9. Trente jours de gelées, répartis sur cinq mois (novembre à mars), cinq à six gelées de — 5°.

Le *vent* dominant se situe, toute l'année, entre Sud et Ouest. Les vents de Nord-Est sont plus fréquents durant les mois de printemps.

Indices climatiques : de Lang : 76 ; de De Martonne : 38 ; de Emberger : 193.

LA VÉGÉTATION.

Dans cette note préliminaire, seuls sont étudiés les groupements de la série xérocère, telle qu'elle est définie par Westhoff (1947), (= Dunen-Serie de Braun-Blanquet et de Leeuw, 1936, = série psammophile de Hocquette, 1927).

Cette série comprend, à Wimereux-Ambleteuse, neuf groupements principaux :

a) *Cakiletum arenariae* : haut de plage et « laisses de haute mer », à *Cakile maritima*, *Atriplex tornabeni*, *Atriplex glabriuscula*, *Salsola kali*.

b) *Agropyretum juncei* : haut de plage et dunes embryonnaires à *Agropyrum junceum* dominant et rares *Salsola kali*, *Cakile maritima*, *Atriplex tornabeni*, *Calystegia soldanella*.

c) *Ammophiletum arenariae* : dunes mobiles à *Ammophila arenaria* dominant, accompagné de *Festuca dumetorum*, *Cerastium tetrandrum*, *Myosotis arenaria*, et de quelques *Euphorbia paralias*, *Calystegia soldanella*, *Eryngium maritimum*.

d) *Festucetum dumetori* : dunes et pannes sèches à *Festuca dumetorum* dominant, accompagné d'*Euphorbia paralias*, *Carex arenaria*.

e) *Tortuleto-Phleetum arenariae* : dune noire à *Tortula ruraliformis*, *Phleum arenarium*, *Sedum acre*, *Erodium cicutarium*, *Viola curtisii*, *Myosotis arenaria*, *Carex arenaria*, *Camphothecium lutescens*.

f) *Corynephorretum canescentis* : dunes à *Corynephorus canescens*, *Tortula ruraliformis*, *Cladonia* div. sp., *Teesdalia nudicaulis*, *Filago* div. sp., *Jasione montana*, *Saxifraga tridactylites*.

g) *Hippophaeto-ligustretum* : fourrets à *Hippophae rhamnoides*, *Ligustrum vulgare*, *Sambucus nigra*, *Salix arenaria*.

h) *Prairie maigre* à *Anthoxanthum odoratum*, *Festuca ovina*,

Aira procoxa, *Carex arenaria*, *Luzula campestris*, *Koeleria albes-cens*, *Rumex acetosella*, *Silene nutans*, *Hieracium pilosella*.

i) *Calluneto-Genistetum* : lande à *Calluna vulgaris*, *Hieracium umbellatum*, *Hieracium pilosella*, *Aira procoxa*, *Festuca ovina*.

LES SOLS.

Le tableau I résume les principaux caractères physico-chimiques du substratum de ces divers groupements végétaux.

On y remarquera, en premier lieu, la disparition rapide du chlorure de sodium, dès l'*Ammophiletum*.

La teneur en calcaire total est relativement faible : 3 à 6 p. 100. Elle est du même ordre que celle indiquée par Hocquette (1931), dans les dunes du littoral flamand ; elle devient nulle dans les vieilles dunes.

La proportion de calcaire total de ces dunes est donc nettement inférieure à celle des sables du Cotentin (Turmel, 1949), et surtout du littoral Nord-Breton (Corillion, Géhu, Géhu-Franck, 1959) ou des rivages de l'île d'Oléron (Daste, 1959).

Le calcaire actif n'existe qu'à l'état de traces et uniquement dans les associations de dunes mobiles. Il disparaît rapidement vers l'intérieur, favorisant l'abaissement du pH. La quasi-absence de cette forme calcaire, dans les dunes du Pas-de-Calais, y explique l'apparition des groupements à *Corynephorus canescens* et à *Calluna vulgaris*, inconnus sur les sables de la côte Nord-Bretonne où les carbonates actifs persistent jusque dans la dune fixée (J. Géhu-Franck, 1959).

La teneur en matière organique, assez élevée dans le *Caliletum*, est très faible dans la dune à *Agropyrum*, à *Ammophila* et à *Festuca dumetorum*. Elle s'élève, progressivement, dans les dunes à *Tortula* et à *Corynephorus*, pour atteindre ses valeurs les plus hautes dans l'*Hippophaetum*, la prairie à *Anthoxanthum* et la lande à *Calluna*. L'humus suit sensiblement la même courbe à travers cette succession de groupements.

Le rapport carbone/azote, de valeur moyenne dans les groupements de dunes proprement dites (13 à 15), s'élève, nettement dans la prairie et surtout dans la *Callunaie* (24, 8).

LA MICROFLORE.

Les principaux groupes de germes telluriques ont été étudiés selon les méthodes en pratique dans le Service de Microbiologie du Sol de l'Institut Pasteur de Paris (Pochon et coll., 1954).

Les analyses ont été pratiquées sur un échantillon moyen de sol soigneusement homogénéisé. Pour ce faire, une vingtaine de prélèvements ont été pratiqués, dans toutes les conditions d'asep-

TABLEAU I

Groupements végétaux	pH élec- tro- mé- trique	H ₂ O actuelle	CO ₂ Ca total	CO ₂ Ca actif	Chlo- rures ClNa	Matière orga- nique	Carbone	Azote	C/N	Humus total
Estran	7,15	5,5	7,5	traces	0,20	—	—	—	—	—
Haut de plage à <i>Cakile maritima</i>	7,95	3,3	5,6	traces	0,20	0,33	0,193	0,012	15,3	0,023
Haut de plage à <i>Agropyrum junceum</i>	8,2	4,2	6,6	traces	0,15	0,12	0,045	0,003	15	0,018
Dunes à <i>Ammophila arenaria</i> ..	7,7	4,09	5,1	traces	0,10	0,17	0,065	0,005	13	0,033
Dunes à <i>Festuca dimetorum</i>	8,05	6,79	2,8	0	0	0,09	0,055	0,004	13,2	0,020
Dunes à <i>Tortula ruraliformis</i> ...	7,6	3,6	2,8	0	0	0,19	0,109	0,008	13,6	0,124
Fourrés à <i>Hippophae rhamnoides</i>	6,32	1,17	3,2	0	0	1,34	0,778	0,044	17,5	0,687
Dunes à <i>Corynephorus canescens</i>	6,25	0,9	0	0	0	0,43	0,437	0,030	14,1	0,147
<i>Calluneto-Genistetum</i>	5,5	6,09	0	0	0	3,60	2,096	0,058	35,6	0,736
Prairie à <i>Anthoxanthum odoratum</i>	6	11,47	0	0	0	2,26	1,317	0,053	24,8	0,380

(*) Les analyses sont effectuées suivant les techniques indiquées par Duchaufour dans son *Manuel de Pédologie* et les résultats exprimés en grammes pour cent de terre fine séchée à l'air.

sie requises, au niveau de chaque groupement, dans la zone d'épanouissement racinaire maximum. Tamisage et concentration des échantillons ont été réalisés selon la technique préconisée par Daste (1958). Les résultats obtenus, à partir de ces échantillons moyens, peuvent donc être considérés comme le reflet de

GROUPES PHYSIOLOGIQUES	<i>Estran</i>	<i>Cakiletum</i>	<i>Agropyretum</i>	<i>Ammophile</i>
<i>Germes fixateurs d'azote :</i>				
<i>Azotobacter</i> : m. liq.	0	0	0	190
<i>Azotobacter</i> : SiG.	0	0	0	70
<i>Clostridium</i> : m. liq.	0	12	0	90
<i>Germes protéolytiques</i> : m. liq.	— 2 en 22 j	— 4,3 en 22 j	— 4 en 18 j	— 4,6 et
<i>Germes ammonifiants :</i>				
plaque de terre au sang m. liq.	13,2 au 3 ^e j — 1,8 et — 3,3	18,2 au 5 ^e j — 4,5 et — 5,5	10,7 au 4 ^e j — 4,5 et — 5,5	10,5 au — 5 et —
<i>Germes nitreux</i> : m. liq.	0	1	0,75	0,8
<i>Germes nitriques</i> : m. liq.	0,5	0,87	0,25	0,5
<i>Germes dénitrifiants</i> : m. liq.	— 1,5 et — 2	— 3 et — 3,8	— 2,4 et — 3	— 2,5 et —
<i>Germes cellulolytiques :</i>				
SiG.	10	100	100	100
aérobies : m. liq.	900	500 000	190 000	1 900 000
anaérobies : m. liq.	12	5 000	1 900	50 000
<i>Germes amylolytiques</i> : m. liq.	— 1,5 et — 2,3	— 3,8 et — 5,1	— 4,1 et — 4,5	— 4,3 et —
<i>Algues</i>	6	950	25	950
<i>Champignons</i>	1 000	300 000	100 000	500 000
<i>Actinomycètes</i>	100	50 000	5 000	65 000
<i>Flore totale</i>	45 000	4 500 000	3 500 000	25 000 000

m. liq. : milieu li

Germes fixateurs d'azote : en milieu liquide, résultats exprimés en nombre

Germes protéolytiques : d

Germes ammonifiants : sur plaque de terre, nombre de millilitres de NH_4OH N/50 au jour de culture

Germes nitreux et nitr

Germes dénitrifiants : disparition des nitrates, en

Germes cellulolytiques : sur SiG, pourcentage de grains de terre posi

Germes amylolytiques : dilution moyenne maxima aux cinquième et dixième jours. A

la « sociorhizosphère », au sens de Pochon et coll. (1960), du groupement végétal correspondant.

Le broyage du sol, lors de la préparation des suspensions-dilutions de terre, a été effectué en mortier stérile, jusqu'à obtention, pour chaque prélèvement, d'une dispersion sensiblement identique. La nature pédologique, très voisine quant à la

structure physique, des divers substrats étudiés, autorise parfaitement la comparaison de leur activité microbiologique.

Sur le tableau II figure un résumé des résultats obtenus lors d'un prélèvement estival (septembre 1960). Les principaux groupes physiologiques y sont étudiés.

<i>Festucetum</i>	<i>Tortuletum</i>	<i>Corynephorretum</i>	<i>Hippophaetum</i>	<i>Prairie</i>	<i>Callunetum</i>
50	150	0	0	0	0
56	28	0	0	0	0
13	90	6	900	90	190
1 en 22 j	— 3,8 en 22 j	— 3,3 en 20 j	— 6,3 en 15 j	— 6,6 en 24 j	— 5 en 15 j
au 2 ^e j	8,2 au 3 ^e j	10,4 au 5 ^e j	14,7 au 5 ^e j	11,7 au 7 ^e j	8,6 au 8 ^e j.
6 et — 5,3	— 5,2 et — 5,6	— 5,6 et — 5,6	— 6,3 et — 7	— 4,3 et — 5	— 4,3 et — 5
0	0	0	0	0	0
0,5	0,12	0,25	1	0,62	0,25
6 et — 3	— 0,5 et — 3,25	— 0,4 et — 2,5	— 2,8 et — 4,4	— 1,6 et — 4,2	— 0,7 et — 3,5
35	55	45	100	90	60
50 000	90 000	400 000	40 000 000	19 000 000	4 000 000
5 000	22	150	4 000	230	400
1 et — 4,5	— 3,5 et 5,3	— 3,3 et — 4,1	— 2,6 et — 5	— 2,8 et — 4,1	— 4 et — 4,8
450	250	250	9 500	2 500	2 500
50 000	550 000	1 000 000	5 000 000	3 000 000	5 000 000
25 000	5 000	100 000	2 000 000	500 000	350 000
00 000	2 500 000	2 500 000	95 000 000	9 500 000	4 500 000

silico-gel.

par gramme de terre ; sur SiG, en pourcentage de grains de terre positifs.

de maxima au nième jour.

um de dégagement est atteint ; en milieu liquide, dilutions moyennes maxima aux cinquième et

ls exprimés en indice.

oyenne maxima aux cinquième et dixième jours.

e jour ; en milieu liquide, nombre de germes par gramme de terre.

ignons, Actinomycètes et Flore totale : nombre de germes par gramme de terre.

I. — LES GERMES FIXATEURS D'AZOTE ATMOSPHERIQUE.

a) *Les Azotobacter*. — Ils ont été recherchés sur silico-gel à la mannite et au pyruvate de sodium.

Leur présence n'a été décelée que dans trois groupements de dunes : l'*Ammophiletum*, le *Festucetum* et le *Tortuletum*. Comme

sur la côte atlantique (Daste, 1958), les *Azotobacter* manquent donc sur l'estran et le haut de plage. Cependant, à l'encontre des sables littoraux d'Oléron, dont les pinèdes hébergent encore des *Azotobacter* (Daste), on constate ici leur disparition dans les groupements de dunes évoluées : *Hippophaetum*, *Corynephorum*, lande et prairie.

La recherche de ces germes en d'autres saisons (hiver et printemps), ainsi que la numération en milieu liquide, si décevante soit-elle, confirme cette répartition.

Par ailleurs, tous les essais de recherche sur « plaque de terre » au pyruvate, même après enrichissement en carbonate et phosphate (carences), sont restés négatifs. Bien plus, l'ensemencement massif de ces plaques par une suspension d'*Azotobacter* n'a donné aucun résultat ; ce qui laisserait penser qu'il existe, dans ces sables, un facteur inhibant leur développement.

b) *Les Clostridium*. — Ils ont été numérés sur milieu liquide. Absents de l'estran, ils existent dans la majorité des groupements. Peu abondants en général, ils sont mieux représentés dans les sables enrichis en matière organique de l'*Hippophaetum* et de la Callunaie.

Au printemps (avril), ils sont plus abondants : 400 germes contre 12 par gramme de terre dans le *Cakiletum*, 9 000 contre 900 dans l'*Hippophaetum*, 1 500 contre 190 dans le *Callunetum*.

II. — LES GERMES PROTÉOLYTIQUES.

Ils ont été étudiés sur milieu à la gélatine.

Ils existent dans tous les groupements, y compris l'estran (niveau des hautes mers de morte eau).

Leur activité est la plus grande dans les groupements de dunes évoluées : *Hippophaetum*, prairie, *Callunetum*. Dans les autres associations végétales, l'activité de ces germes décroît progressivement, de l'*Ammophiletum* au *Corynephorum*. Le *Cakiletum* est plus riche que l'*Agropyretum*.

III. — LES GERMES AMMONIFIANTS.

Ils ont été éprouvés sur milieu liquide à l'asparagine et sur plaque de terre enrichie en poudre de sang. Les résultats obtenus par ces deux techniques ne sont pas comparables, car la deuxième met en jeu les caractéristiques physico-chimiques du substratum. Seul y est en effet titré l'ammoniac dégagé, et non pas la totalité de l'ammoniac formé par la microflore, dont une partie reste fixée sur les particules du sol. Par cette méthode, le dégagement le plus important d'ammoniac a été observé, pour le *Cakiletum* et l'*Hippophaetum*, au bout du cinquième jour. Dans les groupements

de dune mobile, le clocher de la courbe de dégagement d'ammoniac est atteint dès le deuxième ou le troisième jour. Il ne l'est, au contraire, qu'en sept ou huit jours dans la prairie ou la lande.

Le titrage en milieu liquide montre une bonne activité ammonifiante dans l'*Hippophaetum*. Elle paraît moindre dans les autres groupements, dont la richesse en germes ammonifiants paraît très comparable.

La présence de ces germes est à remarquer dans l'estran.

On notera, enfin, que l'activité ammonifiante de tous ces groupements est plus intense au printemps qu'en été.

IV. — LES GERMES NITREUX ET NITRIQUES.

Ils ont été recherchés sur milieu liquide.

Ils sont fort peu représentés, notamment en ce qui concerne les germes nitreux, dans les sables de la série xérocère de Wimereux.

Les nitreux ne sont décelables, durant l'été, que dans les premiers termes de la série : *Cakiletum*, *Agropyretum*, *Ammophiletum*. L'hiver, ils apparaissent de façon sporadique dans d'autres groupements : *Hippophaetum*, *Corynephoretum*.

Les nitriques sont, au contraire, décelables dans tous les groupements, y compris l'estran. Mais leur coefficient reste bas. Leur maximum se situe dans le *Cakiletum* et l'*Hippophaetum*. L'activité vernale est légèrement plus intense, sauf dans la prairie, le *Callunetum* et le *Corynephoretum*.

V. — LES GERMES DÉNITRIFIANTS (fig. 1, courbes 1 à 10).

Ils ont été étudiés sur milieu liquide. La disparition des nitrates est maxima dans l'*Ammophiletum*, puis, par ordre décroissant, dans l'*Hippophaetum*, la prairie, le *Cakiletum*, le *Callunetum*, le *Tortuletum*, le *Festucetum*, l'*Agropyretum*, le *Corynephoretum*, l'estran.

La zone d'apparition des nitrites tend à devenir de plus en plus importante vers la partie droite du tableau II. Peu étendue et précocement disparue dans le *Cakiletum* et l'*Agropyretum*, elle prend plus d'importance dans l'*Ammophiletum*, le *Festucetum*, le *Tortuletum*, le *Corynephoretum*, la prairie et surtout le *Callunetum* et l'*Hippophaetum*, où elle est maxima.

L'apparition de l'ammoniac est toujours tardive (huitième ou dixième jour). Inexistante dans l'estran et le *Cakiletum*, fugace dans l'*Agropyretum* et le *Callunetum*, la zone de l'ammoniac prend plus d'importance dans les autres groupements, notamment dans la prairie.

Pour l'ensemble des groupements, l'activité dénitrifiante est plus intense au printemps que pendant l'été.

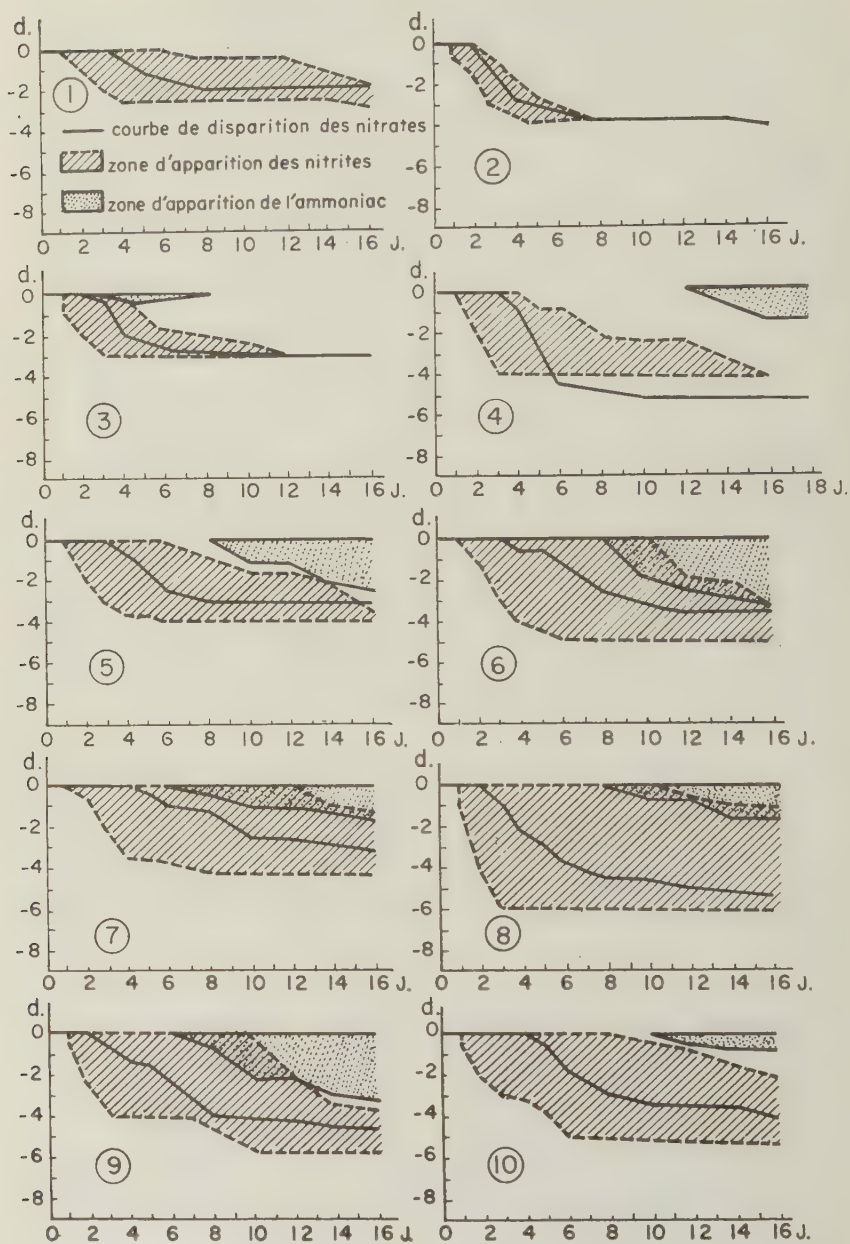


FIG. 1. — Courbes de dénitrification : 1, Estran. 2, *Cakile*tum. 3, *Agropyretum*. 4, *Ammophiletum*. 5, *Festucetum*. 6, *Tortuletum*. 7, *Corynephorretum*. 8, *Hippophaetum*. 9, Prairie. 10, *Callunetum*.

VI. — LES GERMES CELLULOLYTIQUES.

Ils ont été étudiés sur silico-gel au papier et sur milieu liquide à la cellulose broyée (germes aérobies et anaérobies).

Sur silico-gel, on constate au sixième jour une certaine différence d'activité cellulolytique, suivant les associations. Par la suite, celle-ci s'atténue, la positivité des grains de terre atteignant 100 p. 100 pour tous les groupements, à l'exception de l'estran. La microflore cellulolytique est, en effet, constituée, suivant les associations, par des germes différents, à précocité de développement plus ou moins variable.

Plusieurs groupes de cellulolytiques se trouvent dans la plupart de ces sols, mais dans des proportions variables : champignons, Actinomycètes, bacilles anaérobies, Myxobactéries et, plus rarement, des bactéries du type *Celvibrio* ou *Cytophaga*.

Les champignons, les Actinomycètes et Myxobactéries dominent dans l'estran, le *Cakiletum*, le *Tortuletum*, le *Corynephoratum*, le *Callunetum*.

L'activité cellulolytique des autres groupements semble due, plus particulièrement, à des bactéries aérobies ou anaérobies.

L'étude des cellulolytiques aérobies sur milieu liquide à la cellulose broyée est beaucoup plus délicate à mener, en raison des difficultés de lecture.

Néanmoins, malgré son imprécision, ce test permet de mettre en évidence une activité cellulolytique aérobie maxima dans les groupements à couverture végétale relativement importante : *Hippophaetum*, prairie, *Ammophiletum* et *Callunetum*.

Les cellulolytiques anaérobies sont plus spécialement représentés dans les premiers termes de la série psammophile et dans l'*Hippophaetum*. Ils sont moins abondants dans la dune vieillie, du *Tortuletum* au *Callunetum*.

L'activité cellulolytique anaérobie est plus intense durant l'hiver et le printemps que l'été, exception faite toutefois de la prairie et de la lande.

VII. — LES GERMES AMYLOLYTIQUES.

Ils ont été recherchés en milieu liquide. Le maximum d'activité amylolytique se situe dans l'*Ammophiletum*, puis, par ordre décroissant, dans le *Cakiletum*, le *Tortuletum*, l'*Hippophaetum*, le *Callunetum*.

Comme le montrent les courbes de la figure 2, l'amyolyse est généralement plus intense au printemps.

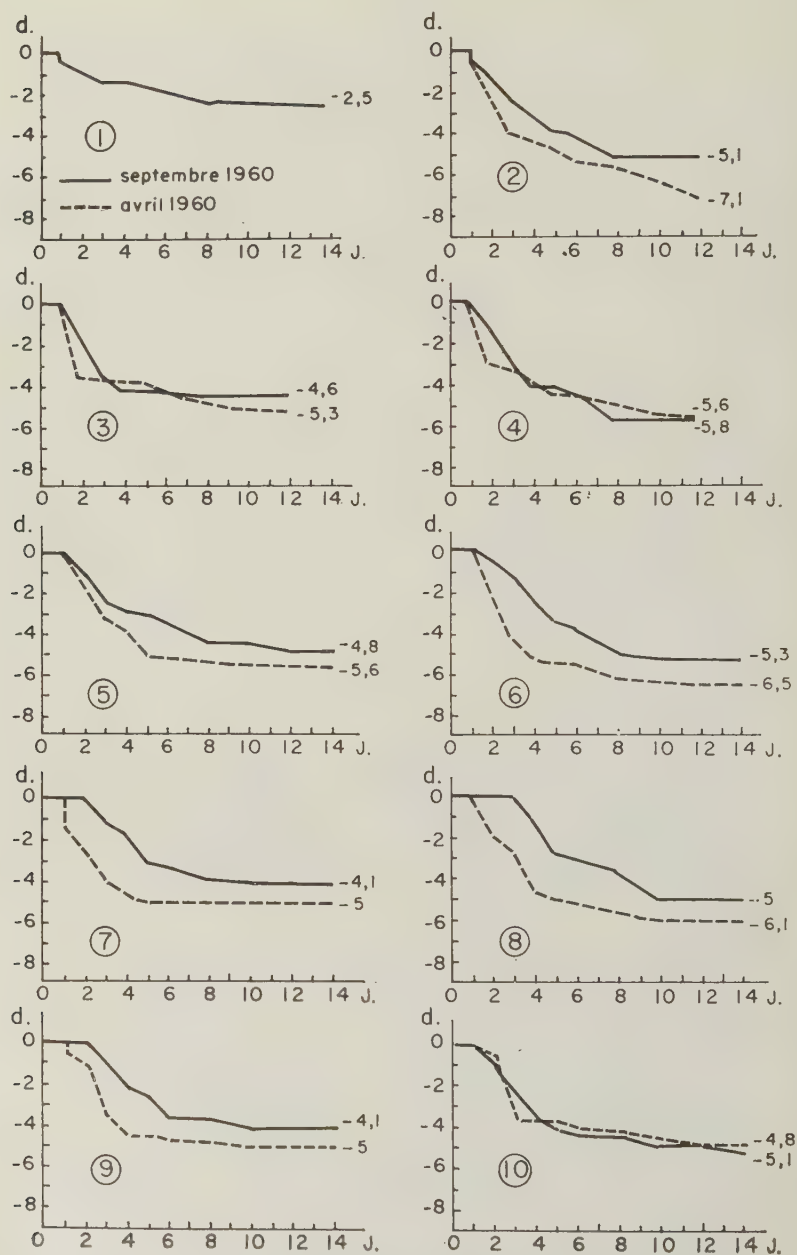


FIG. 2. — Courbes d'amylolyse. Les numéros correspondent aux mêmes groupements que dans la figure 1.

VIII. — LES ALGUES.

La lecture ne peut se faire avant six ou huit semaines et il est avantageux d'exposer les tubes de culture en pleine lumière pour favoriser le développement.

Ce sont en majorité des Chlorophycées et des Cyanophycées. Elles ne sont présentes qu'en petit nombre dans la plupart des associations étudiées, mais deviennent un peu plus nombreuses dans les sols plus riches en matière organique : *Hippophaetum*, prairie et *Callunetum*.

IX. — LES CHAMPIGNONS.

Ils sont également présents dans tous les groupements, y compris l'estran, mais ne deviennent réellement abondants que vers la droite du tableau II, dans les sols enrichis en débris organiques et de pH inférieur à 7 : *Hippophaetum*, *Corynephoretum*, prairie et *Callunetum*.

Dans ces deux derniers groupements, ils paraissent responsables d'une part fort appréciable de l'activité microbiologique.

X. — LES ACTINOMYCÈTES.

Ils ont une répartition sensiblement parallèle à celle des champignons.

XI. — LA FLORE TOTALE.

Il est nécessaire, pour que les chiffres obtenus soient comparables, d'opérer dans des conditions rigoureusement identiques.

La nature de la terre employée pour la préparation de l'extrait de terre qui sert de milieu de culture a une grande importance, ainsi qu'il a déjà été signalé maintes fois. Les résultats très différents obtenus dans la numération de la flore totale de la xérocère de Wimereux, avec un extrait de terre de jardin (pH = 7) et un extrait de sable humifère de l'*Hippophaetum* (pH = 7), confirment ce point de vue.

En voici quelques exemples, pour lesquels les ensemencements ont naturellement été pratiqués à partir des mêmes suspensions-dilutions de terre. La lecture a été faite au quinzième jour, en utilisant les tables de Mc Crady (tableau III).

D'autre part, il convient de faire les lectures au bout d'un nombre de jours identique, car les chiffres obtenus d'une semaine à l'autre, par exemple, sont susceptibles de fortes variations, ainsi

que le démontrent les quelques numérations effectuées sur extrait de sable humifère (tableau IV).

Il semble donc qu'une lecture de contrôle soit nécessaire au

TABLEAU III.

GROUPEMENTS VÉGÉTAUX	TERRE DE JARDIN	SABLE DE DUNES
<i>Ammophiletum</i>	25 000 000	950 000
<i>Festucetum</i>	2 500 000	95 000
<i>Tortuletum</i>	2 500 000	250 000
<i>Hippophaetum</i>	95 000 000	25 000 000
<i>Callunetum</i>	4 500 000	950 000

TABLEAU IV.

GROUPEMENTS VÉGÉTAUX	15 ^e JOUR	25 ^e JOUR
<i>Ammophiletum</i>	950 000	45 000 000
<i>Festucetum</i>	95 000	250 000
<i>Tortuletum</i>	250 000	7 500 000
<i>Hippophaetum</i>	25 000 000	45 000 000
<i>Callunetum</i>	950 000	9 500 000

TABLEAU V.

GROUPEMENTS VÉGÉTAUX	15 ^e JOUR	25 ^e JOUR
<i>Ammophiletum</i>	25 000 000	25 000 000
<i>Festucetum</i>	2 500 000	2 500 000
<i>Tortuletum</i>	2 500 000	2 500 000
<i>Callunetum</i>	4 500 000	9 500 000

vingt-cinquième ou trentième jour, surtout dans le cas de terres riches en champignons ou en germes à développement lent ou difficile, sur extrait de terre. Ceci peut encore rendre compte, pour une part, du fait que l'on trouve, dans certains cas (*Callunetum*), un excès de champignons par rapport à la flore totale.

D'autre part, il faut préciser que les variations des résultats

dans le temps sont ordinairement plus rares et d'amplitude moindre sur extrait de terre de jardin, comme le montrent les quelques exemples du tableau V.

Il semble donc que l'extrait de sable humifère contienne un principe inhibant, ou tout au moins retardant, le développement de la microflore. Quoi qu'il en soit, et j'espère revenir ultérieurement sur ce problème, les chiffres obtenus avec l'extrait de terre de jardin, après quinze jours d'incubation à $+ 28^{\circ}$, me paraissent susceptibles d'être retenus pour l'étude comparative de la microflore totale dans les groupements de la xérocère de Wimereux.

C'est l'*Hippophaetum* qui possède la microflore la plus abondante : il est suivi par l'*Ammophiletum*, la prairie, la Callunaie, le *Cakiletum*, l'*Agropyretum*, le *Festucetum*, le *Tortuletum* et le *Corynephoratum*.

CONCLUSIONS.

Le premier fait qui se dégage de cette étude préliminaire est la pauvreté microbiologique des sables littoraux du Pas-de-Calais. En effet, le groupement le plus riche, l'*Hippophaetum*, ne compte que 95 millions de germes et, si l'on excepte l'*Ammophiletum*, aucun groupement n'atteint l'ordre de grandeur de 10 millions de germes par gramme de sol.

Néanmoins, malgré cette pauvreté, la plupart des groupes physiologiques essentiels appartenant aux cycles de l'azote et du carbone sont représentés dans les divers groupements de la caténa étudiée.

La principale exception concerne les fixateurs d'azote aérobies (*Azotobacter*), qui n'ont été trouvés que dans l'*Ammophiletum*, le *Festucetum* et le *Tortuletum*. La localisation des *Azotobacter*, ainsi mise en évidence, caractérise remarquablement ces trois groupements. Elle confirme leur parenté étroite et leur réciprocity syndynamique bien connue.

La plupart des principaux groupes microbiologiques ont une activité plus intense durant le printemps qu'au cours de l'été. Toutefois, cette stimulation prévernale et vernale de la microflore est surtout sensible dans la dune jeune, où le développement des multiples espèces annuelles a lieu de la fin de l'hiver à avril-mai ; elle l'est moins dans la prairie ou la Callunaie, dont la phénologie est plus estivale.

Après Daste, il est intéressant de constater que l'estran (niveau de haute mer de morte eau) n'est pas totalement dépourvu de microflore. Bien que chaque groupe physiologique n'y manifeste qu'une activité fort modeste, il est remarquable de les retrouver

tous sur l'estran, exception faite des fixateurs d'azote atmosphérique et des germes nitréux.

Dans ses grandes lignes, le type d'activité biologique reste fondamentalement comparable pour les différents termes de la xérocère. Néanmoins, dans le détail, apparaissent suffisamment de variations pour permettre l'individualisation microbiologique de la plupart des groupements étudiés. Bien plus, les différences d'activité microbiologique permettent de confirmer les degrés d'affinité des associations préalablement décelées par l'étude floristique et écologique. Elles fournissent encore de précieuses indications sur la maturité des groupements, leur position syndynamique, leur état de régression éventuelle.

L'*Hippophaetum*, groupement climacique de la dune fixée, non dépourvue de calcaire, apparaît comme le milieu à activité microbiologique la plus intense et la mieux équilibrée.

L'*Ammophiletum*, paraclimax de la dune mobile, possède le même caractère de richesse microbiologique, quoique légèrement atténué. Dans bien des cas, il est d'ailleurs susceptible d'évoluer directement vers l'*Hippophaetum*.

Le passage de l'*Ammophiletum* au *Festucetum*, puis au *Tortuletum*, dans les zones moins mobiles et les pannes sèches, se traduit, au contraire, par un appauvrissement considérable de la microflore et une diminution d'activité de ses principales fonctions. Sous l'angle microbiologique, ces groupements apparaissent ainsi comme régressifs vis-à-vis de l'*Ammophiletum*. Ils évolueront, d'ailleurs, si les sables ne redeviennent mobiles et ne ramènent l'Ammophilaie, vers l'*Hippophaetum* ou, plus sûrement, vers le *Corynephoretum*, annonciateur lui-même de la Callunaie et de la prairie qui en dérive par exploitation. Ces deux derniers groupements, caractérisés par un substratum enrichi en matière organique, à rapport carbone/azote élevé (25), et relativement acidifié, possèdent un type d'activité microbiologique particulier, relativement riche, mais lié à la prépondérance des Champignons et des Actinomycètes.

Intermédiaire entre ceux-ci et les autres groupements de dunes, le *Corynephoretum* en possède certains caractères, tout en gardant, par ailleurs, une flore microbiologique très proche de celle du *Tortuletum* ou du *Festucetum*.

Enfin, apparu à la limite de l'estran, au niveau des « laisses de haute mer » riches en matière organique, le *Cakiletum* possède une activité microbiologique relativement intense, malgré la présence de chlorure de sodium en quantité non négligeable.

Plus pauvre est, par contre, l'*Agropyretum*, dont le type de la microflore fait transition avec l'*Ammophiletum*.

Ainsi, chaque groupement végétal de la série psammophile étudiée apparaît-il caractérisé, non seulement par sa flore phanérogamique ou cryptogamique et les propriétés physico-chimiques de son substratum, mais encore par l'activité microbiologique de sa « sociorhizosphère », véritable « charnière » pour chaque biocénose, entre le monde minéral et le monde végétal.

RÉSUMÉ.

Dans cette note, l'auteur étudie l'activité microbiologique des sables des groupements végétaux de la xérocère des dunes du Pas-de-Calais (France). Ces groupements sont définis par les caractères de leur flore et de leur substratum. Ils sont au nombre de neuf : *Cakiletum arenariae*, *Agropyretum juncei*, *Ammophiletum arenariae*, *Festucetum dumetori*, *Tortuleto-Phleetum arenariae*, *Corynephorretum canescentis*, *Hippophaeto-Ligustretum*, *Calluneto-Genistetum* et prairie maigre à *Anthoxantum odoratum*. Les prélèvements microbiologiques ont été effectués de façon rigoureusement stérile, en de nombreux endroits de chaque groupement, dans la zone d'épanouissement racinaire maxima et n'ont été analysés qu'après homogénéisation très soignée. Les résultats sont donc l'expression de la « sociorhizosphère » du groupement végétal et non d'une ou de plusieurs rhizosphères juxtaposées. Les principaux groupes physiologiques ont été étudiés lors de prélèvements de printemps et d'été. Il s'agit, plus particulièrement, des germes fixateurs d'azote atmosphérique, des germes protéolytiques, des germes ammonifiants, des germes nitreux et nitriques, des germes dénitrifiants, des germes cellulolytiques, des germes amylolytiques, des algues, des champignons et des Actinomycètes. Les techniques employées sont celles utilisées dans le Service de Microbiologie du Sol de l'Institut Pasteur de Paris (Prof. Pochon). La flore totale a été éprouvée sur extrait à base de terre de jardin et sur extrait de sable humifère. La plupart des groupes physiologiques ont révélé une activité différente pour chaque association végétale et les affinités observées, dans cette étude microbiologique d'une série de groupements parfaitement définis, se sont révélées parallèles à celles de la flore et des caractères physico-chimiques du sol.

Dans les dunes, l'activité microbiologique de la sociorhizosphère d'un groupement végétal apparaît ainsi caractéristique du milieu, au même titre que la composition floristique ou que la nature de son substratum. Elle est véritablement « la charnière » entre le monde minéral et le monde végétal et sa connaissance permet de mieux comprendre l'ensemble équilibré qu'est chaque biocénose.

SUMMARY.

MICROBIOLOGICAL ACTIVITY OF THE SANDS OF CERTAIN PLANT GROUPS OF THE PAS-DE-CALAIS LITTORAL.

Studies on the microbiological activity in the sands of the xerophorous groups in the dunes of Pas-de-Calais (France). These groups are determined by the characters of their flora and their substrate. They are nine : *Cakiletum arenariae*, *Agropyretum juncei*, *Ammophiletum arenariae*, *Festucetum dumetori*, *Tortuleto-Phleetum arenariae*, *Corynephoretum canescentis*, *Hippophacto-Ligustretum*, *Calluneto-Genistetum*, and sandy meadow soil containing *Anthoxanthum odoratum*. The microbiological samples have been taken in strictly sterile conditions, from many places for each group, in the maximal root development area, and have been analyzed after careful homogenization. The results correspond therefore to the manifestation of the « sociorhizosphere » of the group, and not to the manifestations of one or several juxtaposed rhizospheres.

The main groups were studied on samples taken in spring or summer. They comprise mainly atmospheric nitrogen-fixing, proteolytic, ammonifying, nitrous and nitric, denitrifying, cellulolytic and amylolytic germs, algae, fungi and Actinomycetes. The techniques used are those of the Department of Soil Microbiology, Pasteur Institute, Paris, (prof. Pochon).

The total flora was tested on an extract of garden soil, or an extract of humiferous sand.

Most of the physiological groups showed a different activity, according to each plant association, and the affinities observed proved parallel to those of the flora and the physico-chemical properties of the soil.

In dunes, the microbiological activity of the sociorhizosphere of a plant group is therefore characteristic of the medium, like the flora composition or the nature of its substrate. It is the actual « hinge » between mineral and plant world, and its study allows better understanding of the balanced process represented by each biocenosis.

*
* *

A la fin de cette note, il m'est fort agréable de remercier vivement M. le Prof. Pochon et ses collaborateurs qui ont bien voulu s'intéresser à ce travail et ne m'ont pas ménagé leurs conseils.

BIBLIOGRAPHIE

- BRAUN-BLANQUET (J.) et LEEUW (W. C. de). *Vegetationsskizze von Ameland*. S. I. G. M. A., 1936, n° 50.
- BRIQUET (A.). *Le littoral du Nord de la France*. Armand Colin, édit., Paris, 1930.
- CORILLON (R.), GEHU (J.-M.) et GEHU-FRANCK (J.). *Bull. Lab. marit. Dinard*, 1959, n° 45, 50-55.
- DASTE (Ph.). *Rev. Cytol. Biol. végétales*, 1958, **19**, suppl. n° 1.
- GEHU (J. M.). *Cahier nat. parisiens*, 1958, N. S. 14, 77-83.
- GEHU (J. M.). *Bull. Soc. Bot. Nord France*, 1960, **43**, 119-124.
- GEHU-FRANCK (J.). *Bull. Soc. Bot. France*, 1959, **106**, 243-247.
- HOCQUETTE (M.). *Bull. Soc. Linn. Nord France*, 1931, 1^{er} sem., n° 422.
- POCHON (J.). *Manuel technique d'analyse microbiologique du sol*. Masson édit., Paris, 1954.
- POCHON (J.), RIVIÈRE (J.) et LAVERGNE (D.). In VIENNOT-BOURGIN : *Rapports du sol et de la végétation. 1^{er} Colloque Soc. Bot. France*. Masson édit., Paris, 1960.
- TURMEL (J. M.). *Mém. Muséum nat. Hist. nat.*, 1949, **28**, 1-72.
- WESTHOFF (W.). *The vegetation of dunes and salt marches on the dutch islands of Terschelling, Vlieland and Texel*, édit., Utrecht, 1947.
-

LA TECHNIQUE DE SÉRO-IDENTIFICATION RAPIDE DES VIRUS POLIOMYÉLITIQUES DANS LES SELLES

I. — PARTIE PRATIQUE

par G.-L. DAGUET, F. ROGER et Annie ROGER (*).

*(Laboratoire Central de Sérologie, hôpital Saint-Louis,
et Service des Virus de l'Institut Pasteur [D^r P. LÉPINE])*

L'introduction des cultures cellulaires comme procédé de multiplication des virus a apporté une véritable révolution dans nos connaissances biologiques sur la poliomyélite.

Toutefois, les procédés classiques de culture des cellules appliqués à la séro-inactivation des virus poliomyélitiques et à ses deux aspects pratiques susceptibles d'intéresser directement le médecin, les réactions de séro-neutralisation et de typage, sont demeurés l'apanage de laboratoires spécialisés en virologie.

Cette situation tient en grande partie à la complexité encore trop élevée des procédés usuels, issus des laboratoires de recherche.

C'est pourquoi nous nous sommes efforcés depuis plus de deux ans de simplifier au maximum les méthodes d'inactivation immunologique des virus poliomyélitiques, notre but étant de doter les laboratoires spécialement orientés vers l'épidémiologie ou le diagnostic d'outils suffisamment maniables pour permettre d'aborder aisément les nombreux problèmes que la poliomyélite pose encore chaque jour dans notre pays et dont la solution est pratiquement devenue possible. Deux d'entre nous ont décrit précédemment, avec P. Lépine, sous le nom de « Technique cinétique » le procédé de séro-neutralisation simple et précis qui leur a semblé répondre le mieux aux exigences actuelles des laboratoires [8]. Des exemples des résultats pratiques auxquels on peut ainsi parvenir ont été rapportés depuis dans le domaine du diagnostic sérologique de la poliomyélite dont nous nous sommes efforcés, avec P. Lépine, de dégager les règles [3, 9, 10, 13], dans celui des enquêtes épidémiologiques [1, 2, 12], ou pour le contrôle d'efficacité des vaccins anti-poliomyélitiques effectué soit au niveau du circuit de produc-

(*) *Société Française de Microbiologie*, séance du 8 décembre 1960.

tion [11], soit directement, chez les vaccinés eux-mêmes [5, 12].

Pour les méthodes d'isolement et d'identification sérologique des virus poliomyélitiques, il restait cependant à accomplir un effort de simplification analogue à celui déjà fourni pour les réactions de séro-neutralisation. Nous avons donc essayé de mettre au point un procédé à la fois simple, spécifique et rapide, mais aussi suffisamment proche de la technique cinétique de séro-neutralisation pour former avec elle un ensemble cohérent et pour pouvoir être utilisé simultanément dans les mêmes laboratoires, comme cela s'impose ordinairement par suite de la communauté fréquente des objectifs à atteindre par la recherche des anticorps neutralisants et par la recherche du virus.

A. PREMIÈRE ÉTAPE : *Préparation de l'extrait de selles*. — Les selles simplement recueillies dans des récipients stériles peuvent être traitées, pour gagner du temps, dès leur arrivée au laboratoire, ou être stockées préalablement à -20°C si on le désire. On en prélève le volume d'une cerise (approximativement 5 g) avec une spatule ou un bistouri stériles et on transvase le prélèvement, soit dans un flacon à pharmacie muni d'un lit de billes de verre, soit encore, dans un broyeur de verre (broyeur de Durand), également stérile, contenant un peu de sable de Fontainebleau.

Si on utilise un flacon à pharmacie, on ajoute 50 ml de milieu à l'hydrolysate de caséine sans sérum, on bouche et on agite énergiquement, soit à la main, soit avec un agitateur alternatif, jusqu'à homogénéisation complète, avant de transvaser dans un pot à centrifuger de 45 ml.

Si on emploie un broyeur de verre, la manipulation s'effectue avec commodité sous une hotte aspirante d'Armand Delille où l'on introduit uniquement les mains gantées de caoutchouc. On obtient alors la suspension en ajoutant progressivement le milieu au cours de l'homogénéisation. On transvase finalement aussi dans un pot à centrifuger pyrex de 45 ml qui est ensuite rempli de milieu et agité par retournement.

On centrifuge alors à 5 000 *g*, soit immédiatement, soit après une décantation de dix-huit heures à $+4^{\circ}\text{C}$, en se servant de préférence d'un centrifugeur refroidi (à défaut, on peut utiliser un centrifugeur ordinaire, mais après avoir amené l'extrait à 0°C).

Après vingt minutes de centrifugation, on obtient une séparation en trois couches : une couche superficielle grasseuse, une couche intermédiaire liquide et un sédiment épais dans le fond.

On prélève très soigneusement 20 ml de liquide intermédiaire à l'aide d'une seringue montée avec une aiguille de 12/10 en évitant tout remous dans le liquide et en laissant la pointe de l'aiguille à mi-distance des deux couches extrêmes.

On transvase dans une seconde série de pots à centrifuger où l'on ajoute un égal volume de milieu et on centrifuge trente minutes à 10 000 *g*, soit dans des tubes plastiques stérilisés aux U. V. soit dans des pots en verre pyrex (1).

On obtient ainsi, la plupart du temps, un liquide clair directement utilisable pour les cultures mais auquel on ajoutera d'abord un mélange pénicilline-streptomycine préparé avec une eau bidistillée stérile (Q. S. P. 700 U. O. de pénicilline et 175 μ g de streptomycine/ml) et une solution alcoolique de mycostatine (Q. S. P. 20 μ g/ml).

Dans certains cas, la séparation n'est pas encore parfaite et le liquide reste légèrement trouble ; cela signifie que la concentration de l'extrait est encore trop grande et il suffira de diluer à nouveau au demi pour obtenir, après une troisième centrifugation, un éclaircissement et une stérilisation bactériologique suffisants pour les cultures cellulaires.

Si l'extrait présente un caractère acide, on peut éventuellement corriger le pH par addition de quelques gouttes de soude au centième en se basant sur le virage du rouge de phénol.

B. DEUXIÈME ÉTAPE : Ensemencement des cultures. — On distribue stérilement l'extrait de selles dans des tubes de Kahn en verre neutre disposés par groupes de trois à raison de 0,45 ml par tube.

Par rapport au typage sérologique proprement dit, les trois premiers tubes constituent les « témoins sans sérum de référence », les autres tubes recevant tous des immunsérums : les tubes n^{os} 4, 5, 6 0,05 ml de sérum anti-I titré, les tubes 7, 8, 9, une quantité équivalente de sérum anti-II, les tubes 10, 11, 12, le sérum anti-III et les tubes 13, 14 et 15 le mélange des 3 immunsérums, toujours sous le volume de 0,05 ml.

Par rapport à l'isolement, les tubes utiles sont au nombre de 9 si les selles ne contiennent qu'un seul virus poliomyélitique : si le virus est, par exemple, de type III, il pourra se développer dans les trois premiers tubes (sans immunsérum) et dans les six tubes suivants (qui ont reçu le sérum anti-I ou le sérum anti-II) mais il ne pourra se multiplier dans les six derniers tubes qui ont tous reçu du sérum anti-III.

(1) A cette vitesse relativement élevée, l'équilibrage des pots à centrifuger pyrex doit être correctement effectué, ce qui revient à dire que la couronne entière doit être garnie de pots amenés exactement au même poids. Il faut aussi toujours utiliser au fond des cupules un tampon d'ouate hydrophile changé chaque fois, l'intervalle compris entre la cupule métallique et le pot de verre étant, par ailleurs, entièrement rempli d'eau.

Après distribution des immunsérums, on porte les tubes à l'étuve à 37° C pendant trois heures pour assurer la neutralisation des virus poliomyelitiques (éventuellement présents dans les selles) sous l'influence des anticorps homologues, puis on ajoute dans chaque tube 0,50 ml d'une suspension de cellules KB obtenue par trypsination (à raison de 25 000 cellules par tube). On recouvre la surface du liquide avec 0,40 ml d'huile de vaseline stérilisée par autoclavage à 105° et on met à nouveau les portoirs (recouverts préalablement d'une feuille de papier d'aluminium stérilisée par flambage) à l'étuve à 37° C ; on peut, si on le désire, remplacer l'huile de vaseline par des bouchons pour les trois premiers tubes (bouchons de caoutchouc non toxique, qualité plasma) afin de pouvoir ultérieurement recueillir plus facilement le virus développé dans les témoins sans sérum.

C. TROISIÈME ÉTAPE : *Examen des cultures et interprétation des résultats.* — Avec le milieu utilisé, les cellules KB adhèrent rapidement au verre dans le fond des tubes de Kahn et se multiplient ensuite activement pendant cinq jours, puis se maintiennent en survie pendant cinq autres jours sans présenter d'altérations microscopiques susceptibles de créer des confusions avec les lésions cellulaires dues au virus.

Elles doivent être examinées pour l'isolement pendant toute cette période et pour le typage pendant les six premiers jours.

On utilise pour cela un microscope inversé qui permet d'étudier la coupole cellulaire au fond des tubes de culture (microscope fabriqué en France sous le nom de « Microscope inversé pour Cultures Cellulaires » par Stiassnie, et en Allemagne sous le nom de « Microscope de Chimiste » par Leitz et de « Microscope à Plancton » par Zeiss), le grossissement usuel étant compris entre trente et soixante fois.

Si le diagnostic de type est urgent, le premier examen peut être fait dès la quinzième heure et, pour cela, il est commode de mettre les portoirs à l'étuve à 18 heures pour pouvoir faire la première lecture le lendemain à 9 heures. On peut ensuite faire une deuxième lecture vers la dix-huitième heure et une troisième lecture après vingt-quatre heures d'étuve. Pendant le deuxième jour, on peut aussi effectuer à nouveau deux lectures : une le matin et une autre en fin d'après-midi ; *dans la pratique cependant et pour la simplification du travail du laboratoire, une seule lecture par jour est largement suffisante.*

Avec le procédé décrit ici, nous n'avons que très rarement observé une toxicité des extraits de selles pour les cultures cellulaires [les cultures sont, au contraire, la plupart du temps tout à

fait remarquables comme si l'extrait apportait par lui-même des facteurs de croissance dans le milieu] (2).

Toute destruction des cellules peut donc être considérée de façon très probable comme provoquée par un virus, cette conclusion provisoire pouvant être corroborée ensuite, si on le désire, pour les virus non poliomyélitiques, par le passage en série au voisinage du titre limite, seul critère définitif de multiplication et, par conséquent, de virulence.

Pour les virus poliomyélitiques, leur existence dans l'inoculum est *certaine* dès qu'il est possible de constater une destruction des cellules dans les tubes témoins sans sérum de référence (qui jouent le rôle de véritables témoins-virus dans des réactions de séro-neutralisation), cette destruction étant *spécifiquement inhibée* en présence d'un des immunsérums de référence utilisés dans les autres tubes, ce qui conduit immédiatement à l'identification du type.

Si une partie des tubes de culture seulement présentait des cellules détruites, cela voudrait dire que le virus présent dans l'inoculum s'y trouvait à une concentration voisine de la limite de sensibilité de la technique et il faudrait reprendre le liquide des tubes détruits pour se livrer à un nouveau typage sur une seconde série de quinze tubes.

Si, par extraordinaire, il existait *plusieurs virus poliomyélitiques dans l'extrait*, soit par association fortuite (tout à fait exceptionnelle) soit par absorption volontaire (comme cela peut avoir lieu par administration orale des souches vivantes atténuées utilisées en association), la neutralisation ne serait effective que dans les tubes correspondant au mélange des trois immunsérums. L'identification des virus poliomyélitiques isolés nécessiterait alors un *second* passage. On pourrait utiliser soit un nouvel extrait, soit le contenu des trois premiers tubes du premier passage, l'association de virus étant étudiée en présence de mélanges de sérums de référence utilisés deux à deux (I + II, II + III, I + III). On pourrait aussi, très avantageusement, se servir de la neutralisation partielle déjà obtenue au premier passage, les tubes qui ont reçu un immunsérum étant débarrassés de virus homologue, et partir alors du contenu des tubes 4, 5 et 6 qui ont reçu du sérum anti-I, par exemple, pour rechercher les souches de type II et de type III.

Le tableau I donne un exemple des différents résultats possibles et de l'interprétation qu'il convient d'en donner.

(2) Cependant, la stérilisation de l'extrait n'est parfois que transitoire et un trouble gênant peut apparaître dans quelques cas, au troisième ou quatrième jour.

TABLEAU I. — Exemple de lecture et d'interprétation des résultats.

Témoins sans sérum de référence	Sérum anti-I					Sérum anti-II					Sérum anti-III					Sérum + anti-I + anti-II + anti-III					<u>Interprétation</u>
	+					-					-					+					
	-					+					+					-					
	-					+					+					-					
-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	Virus poliomyélitique de type I		
-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	Virus poliomyélitique de type III		
-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	Virus poliomyélitique de type II		
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Virus entérique non po- liomyélitique probable(*)		
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	Mélange de plusieurs vi- rus poliomyélitiques(**)		
-	+	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	Virus de type III pro- bable mais à la concen- tration voisine de la limite de sensibilité du test (***)		
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15					N° des tubes		

- : cellules détruites, + : cellules protégées. (*) : A vérifier par passages en série au voisinage du titre limite. (**): Séro-identification à reprendre avec trois séries de tubes correspondant aux mélanges des tubes (1 + 2 + 3), (4 + 5 + 6), (7 + 8 + 9) de cet essai. (***) : Test à refaire avec le mélange des tubes 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, comme inoculum.

RÉSULTATS.

Nous avons étudié les selles de 54 malades. Elles provenaient d'individus ayant présenté des syndromes paralytiques (50 cas dont 10 associés à un syndrome méningé), un syndrome méningé simple (1 cas), ou ayant été en contact avec des poliomyélitiques (3 cas de contact avec une poliomyélite de type I).

Pour 53 sujets, le sérum a également pu être examiné simultanément par la technique cinétique de séro-neutralisation (prélèvement unique dans 18 cas, double prélèvement dans 30 cas, prélèvement triple dans 4 cas).

Les résultats des réactions de séro-neutralisation sont consignés dans le tableau II, et ceux des isoléments-identifications dans le tableau III.

On peut noter dans le tableau II, l'influence de l'âge sur les

TABLEAU II. —
Résultats obtenus pour les 53 cas étudiés sérologiquement.

	Diagnostics fermes : 33 (62,5 %)		:	Poliomyélite
			:	sérologiquement
	Exclusion	Diagnostic	:	possible
	sérologique	sérologique du	:	ou vraisemblable
	de la poliomyélite	type	:	
Nombre de cas	10	23	<div> 15 I 2 II 6 III </div>	20
Proportion	19%	43,5%	:	37,5%
Age moyen			:	
(moyenne géométrique des âges)	22,5 ans	14 ans	:	25 ans

résultats de l'examen sérologique, les chances de porter un diagnostic sérologique par exclusion augmentent, en effet, avec l'âge (3), alors que les chances d'un diagnostic positif de type diminuent.

Le tableau III montre la plus grande fréquence des isoléments chez les individus les plus jeunes mais aussi dans le groupe où

(3) Exception faite pour les jeunes enfants à sérologie encore négative.

les prélèvements ont été les plus précoces, les meilleures chances d'isolement correspondant à des prélèvements effectués en moyenne pendant les huit premiers jours de la maladie (4).

La comparaison des deux techniques de diagnostic, la technique virologique et la technique sérologique, par rapport aux 53 comparaisons possibles, est représentée dans le diagramme qui résume sous les rubriques A et B les avantages et les inconvénients des deux méthodes utilisées isolément et illustre, sous la rubrique C, les zones de diagnostic délimitées par les deux procédés utilisés en association (fig. 1).

L'examen du diagramme montre la prééminence des réactions de séro-neutralisation, seules capables de conduire à l'exclusion

TABLEAU III. — Résultats de la séro-identification rapide pour les 54 prélèvements de selles.

	Séro-identification positive	Séro-identification négative
Nombre de souches	23 <div> { 17 I 1 II 3 III </div>	31
Proportion	42, 5 %	57,5 %
Age moyen (moyenne géométrique des âges).	11, 5 ans	22,5 ans
Date moyenne de prélèvement (moyenne géométrique des dates).	7,5 jours	14 jours

formelle des infections poliomyélitiques (19 p. 100) et permettant, par ailleurs, d'obtenir un pourcentage de diagnostics de type (43,5 p. 100) aussi élevé que celui obtenu par le simple isolement (42 p. 100).

Mais c'est évidemment l'association des deux procédés qui conduit aux meilleurs résultats et qui doit être préconisée en conclusion, les champs d'application des deux techniques n'étant pas

(4) Six virus entériques non poliomyélitiques ont également été obtenus lors des essais d'isolement : 3 chez des individus à poliomyélite formellement exclue du point de vue sérologique, 1 dans le groupe des individus à poliomyélite sérologiquement possible mais de type non précisé et 2 chez des sujets dont la poliomyélite d'un type donné pouvait être sérologiquement affirmée.

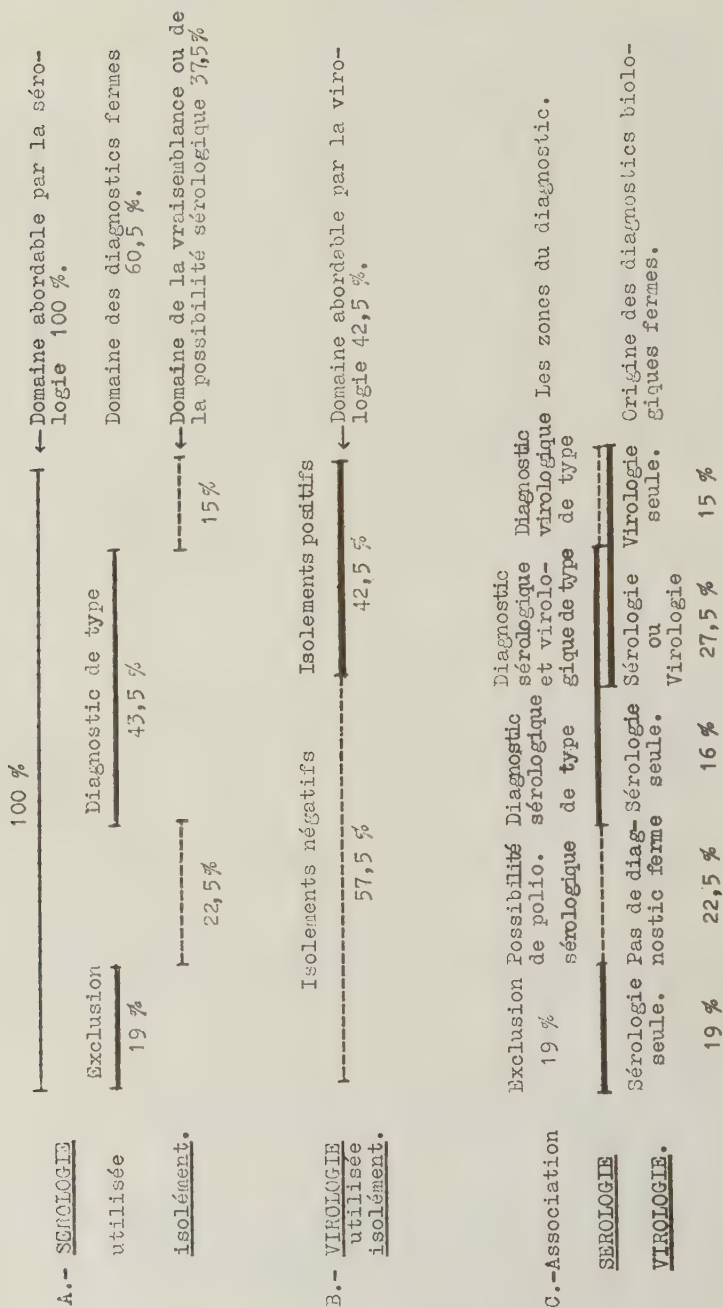


FIG. 1. — Part des deux types de technique dans le diagnostic biologique de la poliomyélite (d'après les 54 cas étudiés).

superposables : la proportion des diagnostics fermes (exclusions ou diagnostics de type) s'approche, en effet, alors de 80 p. 100.

La rapidité du procédé de caractérisation des virus ressort clairement du relevé des dates de typage pour les 20 souches identifiées au premier passage (5) [les dates ayant été obtenues avec le procédé simplifié de lecture quotidienne unique] :

2 souches ont, en effet, été typées au deuxième jour,
12 au troisième jour,
4 au quatrième jour,
1 au cinquième jour,
1 au sixième jour.

La moyenne géométrique des temps est donc de trois jours pour ces 20 souches, ce qui revient à dire que le *typage est acquis le plus souvent dans le délai nécessaire à la mise en évidence et au titrage des anticorps sériques.*

La Réaction de Séro-Identification des virus poliomyélitiques dans les selles mérite donc bien le qualificatif de « rapide » et se montre parfaitement adaptée aux objectifs proposés au départ : son association étroite avec la Technique Cinétique de Séro-Neutralisation.

RÉSUMÉ.

L'extrait de selles réalisé directement par homogénéisation dans le milieu de culture est ensuite soumis à un cycle de centrifugations et reçoit un mélange approprié d'antibiotiques avant d'être porté dans 15 tubes de Kahn (3 tubes témoins, 3 tubes par sérum spécifique et 3 tubes contenant le mélange des 3 immunsérums).

Les tubes sont maintenus trois heures à 37° C avant de recevoir 25 000 cellules KB et d'être recouverts d'huile de vaseline. Ils sont alors portés à nouveau à l'étuve à 37° C pendant dix jours.

L'examen des tubes s'effectue chaque jour au microscope inversé (critères d'interprétation décrits dans le texte).

La rapidité du typage sérologique assuré par ce procédé est bien mise en évidence par la date moyenne d'identification qui a été de trois jours pour 23 souches.

La « Technique de Séro-Identification » est spécialement destinée à être utilisée en parallèle, pour l'épidémiologie et le dia-

(5) Pour trois souches de virus, la concentration virale a été trop faible dans l'inoculum pour qu'on puisse obtenir une lyse homogène au premier passage : l'identification des souches isolées n'a donc pu être faite qu'au deuxième passage, c'est-à-dire après une durée totale d'étude de sept à huit jours.

gnostic, avec la « Technique cinétique de séro-neutralisation » antérieurement décrite [8] : elle a par suite été étalonnée de façon à présenter avec elle le maximum d'analogies pratiques (le détail de la préparation des milieux de culture, de la technique de numération cellulaire et de la préparation et du titrage des sérums de référence est décrit en annexe).

L'association des deux procédés est excellente, notamment pour le diagnostic, et dans 54 cas étudiés simultanément par les deux procédés, le pourcentage de diagnostics fermes s'est élevé à 77, 5 p. 100, proportion nettement supérieure à celle atteinte par chacun des deux procédés utilisés isolément (60,5 p. 100 pour la sérologie et 42,5 p. 100 pour la séro-identification).

SUMMARY

TECHNIQUE OF RAPID SERO-IDENTIFICATION OF POLIOVIRUSES IN STOOLS.

I. — PRACTICAL STUDIES.

The stools are extracted by means of direct homogeneization in the culture medium. The extract is submitted to a cycle of centrifugations and, after addition of a mixture of antibiotics, is distributed into 15 Kahn's test-tubes (3 controls, 3 tubes for each specific immune serum, and 3 tubes containing a pool of the three immune sera).

The tubes are incubated for three hours at 37° C. 25 000 KB cells are then added to each tube, under a layer of liquid paraffin, and again incubated at 37° C for ten days.

Examination of the tubes is carried out every day, by means of an inverted microscope (see text).

Serological typing by means of this technique is very rapid : average time for 23 strains : three days.

For epidemiological and diagnostical studies, the sero-identification technique should be used simultaneously with the kinetic sero-neutralization technique previously described [8] : it has been standardized in order to present the closest possible correlation with the latter method (for preparation of culture media, cellular count technique and preparation and titration of standard sera, see Appendix).

The results obtained by means of the combination of the two techniques are quite reliable, particularly in diagnostic studies : out of 54 cases simultaneously studied with both methods, the percentage of reliable diagnostics was 77.5 %, a proportion markedly higher than that obtained with each one used alone (60.5 % with the sero-neutralization, 42.5 % with the sero-identification).

ANNEXE.

1° MILIEU AU TRIS SANS SÉRUM (milieu de suspension des selles). — Ce milieu est une variante de celui précédemment décrit par P. Lépine et coll. [6, 7], variante également utilisée dans le premier temps des réactions de séro-neutralisation [8].

Nous ne donnerons pas ici la formule du milieu à l'hydrolysate de caséine (que l'on peut trouver ailleurs), car ce milieu est actuellement préparé sous une forme concentrée dix fois par l'Institut Pasteur : il suffit donc d'effectuer stérilement une dilution du milieu concentré de l'Institut Pasteur :

Milieu concentré	100 ml
Eau bidistillée	900 ml

et d'y ajouter, en lieu et place du tampon bicarbonate normalement utilisé pour l'entretien et la culture des cellules KB en boîtes de Roux :

10 ml d'une solution concentrée, dérivée des travaux de Swim et Parker [15] (mise au point par le Dr Daniel) [8] et dont la formule est la suivante :

Tris (hydroxyméthyl-amino-méthane)	15	g
ClH concentré	5,8	ml
Phénol-sulfone-phthaléine	0,200	mg
Eau bidistillée	100	ml

2° MILIEU AU TRIS A 16,6 P. 100 DE SÉRUM DE VEAU (pour préparation de la suspension de cellules). — Ce milieu est également employé dans le second temps de la réaction de séro-neutralisation : il est constitué par le milieu précédent simplement additionné de sérum de veau sans anticorps (essai préalable des sérums de veau dans les conditions de concentration utilisées et élimination des sérums qui retardent la destruction cellulaire en présence d'une dose troisième jour des trois virus poliomyélitiques).

La formule de ce milieu est donc :

Milieu au Tris sans sérum	1 000 ml
Sérum de veau filtré	200 ml

3° PRÉPARATION D'UNE SUSPENSION DE CELLULES A 50 000 ÉLÉMENTS PAR MILLILITRE. — Cette suspension est commune aux réactions de séro-neutralisation et au procédé d'isolement et de typage simultanés décrit dans cet article.

On disperse par trypsination [4], après élimination du milieu d'entretien au bicarbonate, les cellules contenues dans une boîte

de Roux prise avant la phase de régression des cultures (ce qui est facilement reconnaissable à l'absence de débris cellulaires à l'examen direct des boîtes au microscope inversé, examen effectué avant le rejet du liquide de culture).

Pour disperser les cellules, on utilise la trypsine purifiée de l'Institut Pasteur en solution à 3 p. 1 000, stérilisée par filtration. On verse 10 ml de trypsine dans la boîte de Roux et on attend le décollement, qui se produit en quelques minutes, en agitant doucement le flacon par un mouvement alternatif autour de l'axe formé par les deux mains, de façon à ce que le liquide passe continuellement sur les cellules.

Après décollement complet du film cellulaire, on transvase dans un pot à centrifuger de 45 ml, on bouche hermétiquement avec un bouchon de caoutchouc percé d'une aiguille de 12/10 montée sur une seringue stérile de 10 ml.

On homogénéise soigneusement par aspiration et refoulement à l'aide de la seringue, puis on centrifuge à 600 t/min pendant cinq minutes ; on rejette alors le surnageant et on remet en suspension dans 20 ml de milieu au Tris à 16,6 p. 100 de sérum en se servant toujours de la seringue (préalablement rincée avec le milieu).

On prélève finalement 0,3 ml de la suspension cellulaire et on porte dans un tube de 12-130 où l'on ajoute 0,3 ml d'une solution hypotonique de violet hexaméthylé pour numération selon la technique de Sanford [14], et dont la formule est la suivante :

Violet hexaméthylé R. A. L.	0,100 mg
Acide citrique	3,85 g
Eau bidistillée	100 ml
Stérilisation par filtration.	

On bouche et on agite violemment par intermittence pendant le contact du colorant et des cellules (c'est-à-dire pendant environ quinze minutes).

On porte finalement dans une cellule de Nageotte (en rejetant les premières gouttes qui s'écoulent de la pipette) et on compte les éléments dans deux rectangles de chaque côté de la ligne médiane et dans les deux rectangles latéraux extrêmes, en se servant d'un objectif $\times 9$, et d'un oculaire $\times 8$ de Stiasnie.

Compte tenu du volume d'un rectangle de la cellule de Nageotte (1,25 ml) et des manipulations effectuées, il suffit alors de diviser le nombre total obtenu par 12,5 pour obtenir le dénominateur de la fraction 1/D correspondant à la dilution à effectuer à partir du contenu du pot à centrifuger pour obtenir une suspension à 50 000 cellules par millilitre.

4° PRÉPARATION ET TITRAGE DES SÉRUMS DE RÉFÉRENCE EN VUE DE LA SÉRO-IDENTIFICATION DES VIRUS POLIOMYÉLITIQUES.

a) *Préparation des sérums de référence.* — On obtiendra les meilleurs résultats du double point de vue du titre obtenu et de la spécificité en utilisant la technique des inoculations dermiques de virus chez le lapin (quatre injections à dix jours de distance, saignée cinq jours après la dernière injection).

Pour l'immunisation, on utilisera les souches classiques Mahoney pour le type I, MEF1 pour le type II et Saukett pour le type III, sous le volume de 1 ml (suspension de titre au moins égal à $10^{6,5}$ DCT₅₀).

b) *Le titrage* sera effectué pour chaque sérum en tubes de Kahn, à virus constant sérum variable, en présence des trois virus polio-myélitiques (sur trois portoirs distincts).

Le titrage en présence du virus homologue a pour objet de déterminer la concentration de sérum capable de neutraliser définitivement le virus pendant les dix jours d'observation utiles. On se servira pour ce titrage de concentrations élevées de virus ($10^{6,5}$ DCT₅₀).

Le titrage en présence des virus hétérologues se propose de vérifier la spécificité du sérum de référence à la concentration qui doit être utilisée pour les typages.

Il sera effectué en présence d'une dose troisième jour de virus comme les réactions usuelles de séro-neutralisation.

Les deux sortes de typages auront par ailleurs lieu dans les conditions exactes de la séro-identification : on étudiera donc le sérum sous le volume de 0,05 ml au moyen d'une série de dilutions échelonnées de 1/2 en 1/2 en partant du sérum pur pour aller jusqu'à la dilution de 1 p. 1 024, le virus étant utilisé sous le volume de 0,45 ml, et on emploiera trois tubes réactifs par dilution sérique et pour chaque virus.

On obtient ainsi après mélange des deux réactifs... le virus et les dilutions sériques, des dilutions finales de sérum de 1 p. 10 à 1 p. 10 240.

On porte les mélanges virus-sérum pendant trois heures à 37° C, puis on ajoute la suspension usuelle de cellules et d'huile de vaseline avant de remettre à nouveau les portoirs à l'étuve à 37° C pendant dix jours et de faire la lecture au microscope inversé.

On utilisera finalement pour les typages deux unités neutralisantes par tube, *c'est-à-dire la concentration de sérum double de*

celle capable de neutraliser définitivement $10^{6,5}$ DCT₅₀ de virus homologue, cette concentration de sérum ne devant provoquer aucun retard de lyse au troisième jour en présence des virus hétérologues.

Le tableau IV donne un exemple de lecture et d'interprétation des résultats.

TABLEAU IV. — Exemples de lecture et titrages en vue de la séro-identification des virus poliomyélitiques (sérum anti-I).

A. - <u>Lecture.</u>		Dilution du sérum (sous le volume de 0,05ml)							
	Date de lecture	Souches Ce virus	1/1	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64
Sérum <u>n° 1</u>	10 jours	homologue	+	+	+	+	+	+	-
	3 jours	II	+	+	-	-	-	-	-
	3 jours	III	+	-	-	-	-	-	-
Sérum <u>n° 2</u>	10 jours	homologue	+	+	+	+	+	+	-
	3 jours	II	+	+	+	+	+	-	-
	3 jours	III	-	-	-	-	-	-	-

B. - Interprétation.

	Dilution limite	Dose test (sous vol. 0,05 ml)	Anticorps hétérologue à la dose test	Conclusion
Sérum n° 1	1/32	1/16	Absents	Utilisable(*)
Sérum n° 2	1/32	1/16	Présents	A éviter

(*) Le sérum n° 1 sera donc utilisé comme sérum de référence de type I à la concentration de 1/16 sous le volume de 0,05 ml. Dans les tubes 13, 14, 15, correspondant au mélange des trois sérums, il sera utilisé après mélange avec les sérums des deux autres types (la concentration utilisée pour le mélange étant de $3/16 = 1/5,33$).

BIBLIOGRAPHIE

- [1] CARVALHO DE SOUSA (J.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1960, **99**, 202-209.
- [2] DAGUET (G.-L.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1959, **97**, 855-856.
- [3] DAGUET (G.-L.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1960, **99**, 103-113.
- [4] DULBECCO (R.) et VOGT (M.). *J. exp. Med.*, 1954, **99**, 165-182.
- [5] GRUMBACH (R.), ROGER (F.) et AYMARD (B.). *Semaine Hôp. Paris*, 1960, **7**, 157-165.
- [6] LÉPINE (P.), SLIZEWICZ (P.), DANIEL (P.) et PACCAUD (M.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1956, **90**, 654-656.

- [7] LÉPINE (P.), DANIEL (P.), PELMONT (J.) et SLIZEWICZ (P.). *Ann. Inst. Past.*, 1957, **92**, 567-575.
 - [8] LÉPINE (P.), ROGER (F.) et ROGER (A.). *Bull. Org. Mond. Santé*, 1959, **20**, 563-578.
 - [9] LÉPINE (P.), ROGER (F.), DAGUET (G.-L.) et ROGER (A.). *Semaine Hôp. Paris*, 1960, **22**, 273-289.
 - [10] LÉPINE (P.), ROGER (F.) et ROGER (A.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1960, **90**, 1-12.
 - [11] LÉPINE (P.), ROGER (F.), SAUTTER (V.) et ROGER (A.). *Bull. Org. Mond. Santé*, 1960, **22**, 273-289.
 - [12] MARTIN (R.), ROGER (F.), DAMAS (J.-P.) et ROGER (A.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1959, **97**, 757-779.
 - [13] ROGER (F.) et ROGER (A.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1960, **98**, 224-228.
 - [14] SANFORD (K. K.), EARLE (W. R.), EVANS (V. S.), WALTZ (H. H.) et SHANNON (J. E.). *J. nat. Cancer Inst.*, 1951, **11**, 773-786.
 - [15] SWIM (H. E.) et PARKER (R. F.). *Science*, 1955, **122**, 466-470.
-

SOCIÉTÉ FRANÇAISE DE MICROBIOLOGIE

(Institut Pasteur, 25, rue du Docteur-Roux, Paris, 15^e)

Séance du 2 mars 1961.

(La séance a eu lieu par correspondance.)

COMMUNICATIONS

ACTION DE LA CHLORPROMAZINE (CPZ) SUR L'INTOXICATION ET L'INFECTION EXPÉRIMENTALES DE LA SOURIS PAR *PASTEURELLA PESTIS* (SOUCHE VACCINALE EV)

par J. GALLUT et G. GIRARD.

(Institut Pasteur)

Dans un travail antérieur, l'un de nous (Gallut [2]) a montré que la CPZ (dont l'action antagoniste sur plusieurs endotoxines et indifférente vis-à-vis de certaines exotoxines bactériennes a été démontrée par d'autres auteurs) n'a pas l'effet protecteur, même partiel, escompté sur l'infection et l'intoxication expérimentales de la souris par *Vibrio cholerae* et par la toxine cholérique, mais que ce médicament a, par contre, une action aggravante constante. Il a été constaté, en outre, que l'effet nocif du traitement par CPZ est inhibé par l'administration préalable de cortisone qui, par elle-même, protège les souris contre l'intoxication cholérique (Gallut [3]).

Il nous a paru intéressant de procéder à des expériences analogues avec le bacille pesteux et sa toxine, pour lesquels les conditions d'action de la CPZ semblent, *a priori*, différentes de celles offertes par *V. cholerae* puisque, d'une part, la toxine pesteuse est de nature exclusivement protidique (Girard et Sandor [5]) et que, d'autre part, la cortisone exalte la virulence de *Pasteurella pestis* (Girard [4]).

MATÉRIEL ET TECHNIQUES.

1° *P. pestis* : souche vaccinale EV (de virulence atténuée).

2° Toxine pesteuse : extraite de ladite souche par le procédé de Grasset et Gory [6], des congélations et décongélations successives.

3° Titrage de la toxicité : il a été fait sur des lots de 30 souris blanches de 15 g, réparties en cinq groupes de 6, chaque groupe recevant des doses de toxine progressivement croissantes sous le volume de 0,5 ml par voie péritonéale. Les résultats ont été notés après soixante-douze heures d'observation. Les doses létales 50 p. 100 et leurs limites de confiance ont été calculées par la méthode de Bonét-Maury, Jude et Servant [4].

4° Chlorpromazine (1) : cette substance a été injectée par voie sous-cutanée à des doses de 4 à 30 mg par kilogramme de poids sous le volume de 0,2 ml. Ces quantités, inférieures à la dose toxique, provoquent chez les souris une narcose et une hypothermie débutant après trente minutes environ et durant six à douze heures.

5° Cortisone (2) : ce produit a été injecté par voie intramusculaire à la dose de 2,5 mg par souris, sous un volume de 0,2 ml (on a vérifié que les souris supportent normalement une dose de 5 mg).

RÉSULTATS.

1° *Intoxication par la toxine pesteuse* (v. tableau). — Dans la première expérience, la DL_{50} souris de la toxine étant 0,0057 ml pour les témoins, elle est égale à 0,007 ml chez les souris ayant reçu 4 mg/kg de CPZ une heure avant la toxine, tandis qu'elle n'est plus que 0,0012

TABLEAU. — Valeurs de la DL_{50} et de ses limites de confiance chez les souris recevant la toxine de *P. pestis* EV avec ou sans traitement par la CPZ.

NUMÉRO DE L'EXPÉRIENCE	TRAITEMENT	DL ₅₀	LIMITES DE CONFIANCES	
			inférieure	supérieure
I	néant	0,0057	0,0020	0,0166
	CPZ 4 mg/kg	0,0070	0,0024	0,0200
	CPZ 20 mg/kg	0,0012	0,0040	0,0034
2	néant	0,0052	0,0026	0,0104
	CPZ 4 mg/kg	0,0025	0,0013	0,0047
	CPZ 30 mg/kg	0,0015	0,0008	0,0025
3	néant	0,0400	0,0180	0,0880
	CPZ 25 mg/kg	0,0022	0,0011	0,0041
	CPZ 25 mg/kg			
	+ cortisone 2,5 mg	0,0079	0,0041	0,0150

(1) Largactil (4560 RP) injectable.

(2) Cortisone Roussel injectable.

chez les souris ayant reçu 20 mg/kg dans les mêmes conditions. On doit noter que le calcul des limites de confiance montre que les différences ne sont pas statistiquement significatives.

Une deuxième expérience donne les résultats suivants :

DL ₅₀ Souris témoins	0,0052 ml
DL ₅₀ Souris traitées par 4 mg/kg de CPZ	0,0025 ml
DL ₅₀ Souris traitées par 30 mg/kg de CPZ	0,0015 ml

Une troisième expérience, pratiquée deux mois plus tard avec le même lot de toxine EV, comprenait trois lots d'animaux : un lot témoin, un lot traité par la CPZ et un lot de souris ayant reçu à la fois CPZ et cortisone. Les résultats ont été les suivants :

DL ₅₀ : souris témoins	0,040 ml
DL ₅₀ : souris traitées par 25 mg/kg de CPZ	0,0022 ml
DL ₅₀ : souris traitées par 25 mg/kg de CPZ + 2,5 mg /souris de cortisone	0,0071 ml

Les différences entre les limites de confiance étant significatives dans les trois cas, cette expérience confirme l'action aggravante de la CPZ et indique un effet antagoniste partiel de la cortisone vis-à-vis de la CPZ. En effet, une expérience préliminaire avait montré que le traitement par la cortisone des souris recevant la toxine pesteuse ne modifiait pas la DL₅₀.

Remarque. — Les différences notables entre la DL₅₀ chez les souris témoins dans les expériences 1 et 2 d'une part et 3 d'autre part, tiennent à ce que les premières furent exécutées avec la toxine fraîchement préparée tandis que la troisième le fut avec le même lot de toxine gardé en glacière (+ 4° C) depuis deux mois et dont le pouvoir pathogène avait sensiblement baissé.

2° *Infection par Pasteurella pestis.* — On a inoculé par voie *péritonéale* à 60 souris réparties en quatre lots de 15, une dose unique de 320 000 germes viables de *P. pestis* EV, dose généralement parfaitement supportée par la souris. Ces germes provenaient d'une culture sur gélose peptonée à 26° C et mis en suspension, après quarante-huit heures d'incubation, en eau salée physiologique. Le premier lot servait de témoin, le deuxième avait reçu 2,5 mg/souris de cortisone, le troisième lot, 30 mg/kg de CPZ et le quatrième simultanément ces mêmes doses de CPZ et de cortisone administrées quatre heures avant l'inoculation de *P. pestis*. Après dix jours d'observation, voici les résultats (le numérateur de la fraction indique le nombre de morts) :

Lot :

1. Témoins : inoculation EV seule	1/15
2. Témoins : inoculation EV + 2,5 mg/souris cortisone.	15/15
3. Témoins : inoculation EV + 30 mg/kg CPZ	0/15
4. Témoins : inoculation EV + 30 mg/kg CPZ + 2,5 mg /souris cortisone	14/15

Cette expérience, tout en confirmant l'action aggravante de la cortisone montre que l'effet de la CPZ est nul sur l'infection des souris par *P. pestis* EV.

DISCUSSION ET CONCLUSION.

1° Des expériences faites avec la toxine pesteuse, il ressort que, si on l'administre aux doses de 20 à 30 mg/kg à des souris, la CPZ aggrave l'effet de la toxine, comme le montre l'abaissement très marqué de la DL_{50} des animaux traités par rapport à celle des témoins. Ces différences sont significatives aux doses de 25 à 30 mg/kg. D'autre part, le traitement par la cortisone, bien que sans effet sur les souris recevant la toxine seule, a relevé significativement la DL_{50} des souris ayant reçu toxine + CPZ. Cet effet anti-toxique ne va pas toutefois jusqu'à contrebalancer l'action aggravante de la CPZ.

Nous pouvons donc supposer que, comme dans le cas de l'intoxication cholérique expérimentale, l'effet aggravant de la CPZ est dû partiellement à son action anti-sécrétoire élective sur la glande surrénale que pallie, jusqu'à un certain point, un apport de cortisone (elle-même sans effet spécifique sur l'intoxication pesteuse).

2° Dans le cas de l'infection des souris par une dose non mortelle de *P. pestis* qui, on le sait, devient mortelle pour les souris traitées par la cortisone, il apparaît que le traitement par la CPZ est sans effet. Les souris qui reçoivent la CPZ seule, résistent à l'infection au même titre que les témoins, tandis que chez les animaux recevant la cortisone, l'administration de CPZ n'empêche pas la mortalité d'être totale.

Dans les conditions de nos expériences, il apparaît donc que la CPZ et la cortisone se comportent en somme vis-à-vis de l'intoxication et de l'infection pesteuses d'une manière opposée : dans l'intoxication, la CPZ est aggravante, la cortisone indifférente ; dans l'infection, la CPZ est sans effet et la cortisone nocive.

Du comportement inverse de ces deux substances, on peut toutefois tirer la même conclusion, à savoir : que la CPZ, tout comme la cortisone, ne doit pas être employée dans le traitement de la peste.

RÉSUMÉ. — Expérimentalement chez la souris, la chlorpromazine (CPZ) aggrave l'intoxication pesteuse. La cortisone ne pallie que peu cette action nocive. D'autre part, la CPZ n'entrave en rien l'exaltation de la virulence par la cortisone de l'infection pesteuse. Ces constatations comportent comme enseignement l'exclusion de ces deux drogues dans le traitement de la peste humaine.

SUMMARY

ACTION OF CHLORPROMAZIN (CPZ) ON EXPERIMENTAL INFECTION OF MICE WITH *Pasteurella pestis* (VACCINAL EV STRAIN)

Chlorpromazin increases the severity of the intoxication in mice experimentally inoculated with plague toxin. Cortisone has but a very weak action on this harmful effect. On the other hand, chlorpromazin does not prevent the enhancement of virulence induced by cortisone in *Pasteurella pestis* infection.

These findings show that the drugs should not be used in the treatment of human plague.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] BONÉT-MAURY (P.), JUDE (A.) et SERVANT (P.). *Rev. Immunol.*, 1954, **48**, 21.
 - [2] GALLUT (J.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1960, **99**, 813.
 - [3] GALLUT (J.). *C. R. Soc. Biol.*, 1955, **149**, 1414.
 - [4] GIRARD (G.). *Thérapie*, 1957, **12**, 15.
 - [5] GIRARD (G.) et SANDOR (G.). *C. R. Acad. Sci.*, **1947**, 224, 1078.
 - [6] GRASSET (E.) et GORY (M.). *C. R. Soc. Biol.*, 1927, **96**, 180.
-

**NOUVELLE TECHNIQUE D'ISOLEMENT
DES MYCOBACTÉRIES
PAR LE LAURYL-SULFATE DE SODIUM**

par A. TACQUET et F. TISON

(*Institut Pasteur de Lille*)

Nous avons exposé dans un précédent travail (Tacquet et Tison [4]) les résultats obtenus à l'aide d'une technique d'isolement des Mycobactéries associant l'hydroxyde de sodium à 1 p. 100 à un détergent anionique, le Teepol. Des études comparatives nous ont permis de constater que les diverses préparations, délivrées sous le même nom dans différents pays, ont en réalité une composition très variable et que seul le Teepol 410 donne des résultats satisfaisants et très supérieurs à ceux des méthodes classiques de traitement des produits d'expectoration (Tison [5]).

L'arrêt de la fabrication du T 410 nous a conduits à choisir, parmi les nombreux détergents que nous avons étudiés (Tison et Loze [7]), une préparation chimiquement pure permettant une meilleure standardisation des techniques utilisées.

Le *lauryl-sulfate de sodium* nous a donné d'excellents résultats et s'est montré, à concentrations égales, moins nocif pour les Mycobactéries que le Teepol 410 (Tacquet et Tison [4]).

ACTION DU LAURYL-SULFATE DE SODIUM SUR LE BACILLE TUBERCULEUX. — Nous avons étudié l'action inhibitrice de diverses concentrations de lauryl-sulfate de sodium, chimiquement pur, sur la croissance de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv.

Les différents milieux de culture, imprégnés en surface de concentrations croissantes de détergent (0,5 mg, 2 mg, 10 mg par tube), ont étéensemencés avec 0,10 ml d'une culture de sept jours, diluée

à 10^{-5} . Quatre milieux ont été utilisés : le milieu de Löwenstein-Jensen contenant 0,75 p. 100 de glycérine, le milieu de Dubos gélosé, le milieu de Dubos dans lequel la gélose a été remplacée par de l'œuf et où la fraction V d'albumine bovine a été ajoutée en surface après coagulation (1), le milieu liquide de Dubos contenant 100 mg de Tween 80 par litre.

Le tableau I montre que 0,5 mg et 2 mg de lauryl-sulfate par tube de milieu de Löwenstein-Jensen n'inhibent pas la croissance de la souche H37Rv.

Dans une étude comparative précédemment publiée (Tacquet et Tison [4]), nous avons constaté que l'action nocive de ce détergent

TABLEAU I. — Croissance de H37Rv (0,10 ml à 10^{-5}) sur quatre milieux imprégnés en surface avec diverses concentrations de lauryl-sulfate de sodium.

MILIEUX DE CULTURE	TUBES TEMOINS	CONCENTRATIONS EN LAURYL-SULFATE, PAR TUBE														
		0,5 mg					2 mg					10 mg				
		1	2	3	4	5 6 *	1	2	3	4	5 6 *	1	2	3	4	5 6 *
Löwenstein-Jensen																
Dubos gélosé																
Dubos à l'œuf																
Dubos liquide																

(*) Numéro des tubesensemencés.

est un peu inférieure à celle du Teepol 410 et que les milieux solide ou liquide de Dubos ne conviennent pas pour l'isolement des Mycobactéries de produits traités par les détergents.

L'expérience actuelle confirme ces constatations et montre également que l'addition d'albumine d'œuf au milieu de Dubos solide permet d'obtenir de meilleurs résultats, puisque la croissance est sensiblement comparable à celle obtenue sur milieu de Löwenstein-Jensen.

POUVOIR D'HOMOGÉNÉISATION. — Différentes méthodes d'homogénéisation ont été comparées sur des produits purulents et muco-purulents selon les modalités suivantes : 1 ml de produit d'expectoration a été mis au contact de 3 ml des solutions étudiées ; le mélange a été agité pendant une demi-heure, puis neutralisé et centrifugé selon la méthode habituelle.

(1) Ce milieu, contenant du vert malachite, se prête très bien à l'isolement des Mycobactéries ou à leur subculture.

Les solutions suivantes ont été comparées :

1. Hydroxyde de sodium à 1 p. 100.
2. Hydroxyde de sodium à 1 p. 100 + Tween 80 à 5 p. 100.
3. Hydroxyde de sodium à 1 p. 100 + lauryl-sulfate de sodium à 4 p. 100.
4. Hydroxyde de sodium à 1 p. 100 + Teepol 410 à 5 p. 100 (25 p. 100 de la solution à 20 p. 100 du commerce).

Cette étude nous a permis d'obtenir d'excellents résultats avec les méthodes 3 et 4 ; ils furent médiocres avec la méthode 1 (culot trop abondant) et mauvais avec la méthode 2 (formation d'un précipité).

Notre choix s'est donc porté sur l'association d'hydroxyde de sodium à 1 p. 100 et de lauryl-sulfate de sodium à 4 p. 100.

ACTIVITÉ SUR LES GERMES DE CONTAMINATION. — Les essais préliminaires effectués sur 10 crachats fétides, très riches en germes aérobies ou anaérobies, avec des concentrations de 5 p. 100 et 4 p. 100 de lauryl-sulfate associé à l'hydroxyde de sodium (1 p. 100), nous ont permis de constater que la concentration de 4 p. 100 était suffisante pour supprimer les germes de contamination.

Notre expérience portant actuellement sur plus de 5 500 produits confirme entièrement nos premières constatations.

TECHNIQUE PROPOSÉE. — Le lauryl-sulfate de sodium pur (2) se prête facilement à la dissolution alcaline : 40 grammes de lauryl-sulfate sont mis en solution dans un litre d'eau distillée portée à 60° ; on ajoute alors 10 grammes de soude pure en pastille. La solution est maintenue à l'étuve à 37° jusqu'à son utilisation.

Homogénéisation. — Mettre dans un flacon 1 ml de produit pathologique et 3 ml (mesurer à la pipette) de lauryl-sulfate alcalin à 37°. Transvaser alors le mélange (afin d'éviter les souillures de paroi) dans un tube à centrifuger conique stérile de 45 ml de contenance au minimum. Agiter une demi-heure sur l'agitateur de Kahn.

Lavage, neutralisation. — Le mélange est ajusté à un pH voisin de 7 par addition de la solution stérile :

Acide sulfurique	0,90 ml
Eau distillée	1 000 ml
Pourpre de bromocrésol à 1/250	2 ml

Un pH correct est obtenu si la coloration bleue ne vire pas franchement au jaune. Centrifuger à 3 000 tours par minute, pendant une demi-heure (Tison et Audrin [6]).

Ensemencement. — Après décantation complète du liquide surnageant, le culot est réparti en totalité sur 5 à 6 tubes de milieu de Löwensten-Jensen dont un tube non glyciné.

RÉSULTATS. — Dans une première série d'expériences, cette méthode a été comparée à quatre autres techniques utilisées selon les modalités qui viennent d'être décrites.

(2) « Serlabo ». Seul le produit pur peut se dissoudre sans précipité dans une solution alcaline.

32 produits d'expectoration, provenant de malades tuberculeux, ont été partagés en cinq parties égales. Chacune d'elles a été traitée par :

1. Le Teepol 410 à 5 p. 100 + hydroxyde de sodium à 1 p. 100.
2. Le Teepol à 5 p. 100 actuellement préparé en France + hydroxyde de sodium à 1 p. 100.
3. Le lauryl-sulfate de sodium à 4 p. 100 + hydroxyde de sodium à 1 p. 100.
4. L'hydroxyde de sodium à 1 p. 100.
5. Le Tween 80 à 5 p. 100 + hydroxyde de sodium à 1 p. 100.

Les conclusions de cette première étude comparative sont les suivantes :

La technique 5 doit être abandonnée, car son pouvoir d'homogénéisation est médiocre et les souillures sont fréquentes. La technique 4 présente les mêmes inconvénients, à un moindre degré. La technique 2 a le désavantage de retarder l'apparition de la culture des bacilles tuberculeux par rapport aux méthodes 1 et 3 ; le produit utilisé n'est pas en outre chimiquement défini.

Dans une seconde série d'expériences, la technique au Teepol 410, déjà éprouvée (Martin-Lalande et coll. [1] ; Noufflard [2] ; Rocher et

TABLEAU II. — Comparaison des résultats obtenus sur 170 crachats très surinfectés, avec le Teepol 410-soude à 1 p. 100 et le lauryl-sulfate-soude à 1 p. 100.

	Teepol 410 + soude à 1 %	Lauryl-sulfate + soude à 1 %
Nombre de cultures positives	31	33
Nombre de tubes positifs	81	95
Nombre de tubes contaminés	30	27

Viallier [3]), a donc été comparée à la technique que nous proposons. Pour se mettre dans les conditions les plus difficiles, ces recherches ont été effectuées de préférence sur des produits très surinfectés ayant déjà provoqué la contamination partielle ou totale des premières cultures traitées par le Teepol (3). Ce choix particulier explique le nombre assez élevé de tubes envahis par les germes de souillures.

170 produits venant d'hôpitaux ou de dispensaires ont été traités par ces deux méthodes.

Les résultats sont réunis dans le tableau II.

(3) En pratique courante, tous les produits, dont une partie a étéensemencée, sont conservés au réfrigérateur. Si, après quelques jours, la première culture est contaminée, le produit est repris et homogénéisé pendant une heure. Notre comparaison a porté de préférence sur ces produits.

L'étude comparative de la précocité d'apparition des colonies et de l'importance de la culture montre que les résultats les plus favorables sont obtenus avec le lauryl-sulfate.

Il convient de souligner enfin que les contaminations observées n'intéressaient la totalité des tubes que quatre fois dans chaque série. Ces chiffres sont peu élevés si l'on tient compte du choix particulièrement défavorable des produits étudiés. L'étude de 1 500 produits, ensemencés entre le 7 novembre et le 3 décembre dans des délais de vingt-quatre heures après leur prélèvement, n'a montré que 10 contaminations totales des tubes ensemencés après traitement d'une demi-heure par le lauryl-sulfate alcalin. Après un second traitement d'une heure de ces mêmes produits, deux cultures seulement ont été à nouveau contaminées.

Cette expérimentation permet d'affirmer que le lauryl-sulfate de sodium, détergent anionique chimiquement défini, peut avantageusement remplacer le Teepol 410 ; il est parfaitement adapté à l'isolement des Mycobactéries de produits fortement contaminés.

RÉSUMÉ. — Une technique d'isolement des Mycobactéries par le lauryl-sulfate de sodium et l'hydroxyde de sodium à 1 p. 100 est décrite. Ce détergent anionique peut avantageusement remplacer le Teepol 410.

Les résultats observés après traitement de produits d'expectoration fortement contaminés se sont montrés nettement supérieurs à ceux obtenus avec l'hydroxyde de sodium à 1 p. 100.

SUMMARY

A NEW TECHNIQUE FOR THE ISOLATION OF MYCOBACTERIA BY MEANS OF SODIUM LAURYL SULFATE.

Description of a technique for isolation of Mycobacteria by means of sodium lauryl sulfate and 1 % sodium hydroxide. This anionic detergent may advantageously replace Teepol 410. The results observed after treatment of heavily contaminated material were markedly better than those obtained with 1 % sodium hydroxide.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] MARTIN-LALANDE (J.), TCHENG KING LO et LO (Y. T.). *Rev. Tub.*, 1960, **24**, 303-321.
- [2] NOUFFLARD (H.). *Traitement de la tuberculose de l'enfant*, Centre International de l'Enfance, Masson, édit., 1956, **353**, 278.
- [3] ROCHER (G.) et VIALIER (J.). *Ann. Biol. clinique*, 1960, **79**, 385-391.
- [4] TACQUET (A.) et TISON (F.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1961, **100**, 153-158.
- [5] TISON (F.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1954, **87**, 735-736.
- [6] TISON (F.) et AUDRIN (J.). *Recherche, isolement et étude du bacille tuberculeux*, Masson, édit., 1956, p. 44.
- [7] TISON (F.) et LOZE (A.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1954, **87**, 445-449.

DEUX SOUCHES DE MYCOBACTÉRIOPHAGES RÉCEMMENT ISOLÉES ET LEUR ACTION SUR DES MICRO-COLONIES D'UNE MYCOBACTÉRIE SAPROPHYTE

par SABURO UYEDA et YOSHIAKI ITO

(Institut de la Tuberculose de l'Université de Kyoto, Japon.
Institut de Bactériologie de la Faculté de Médecine de Lausanne, Suisse)

Gardner et Weiser [3] ont démontré les premiers, en 1947, l'existence d'une variété de phages pouvant agir sur *Mycobacterium smegmatis*. De nombreux travaux ont paru depuis sur cette question. (Hauduroy et Rosset [4], Penso et Ortali [6], Whittaker [9], Hnattko [5], Bowman [4], etc.). En 1954, Froman et ses collaborateurs [2] ont trouvé les premiers phages actifs sur les Mycobactéries virulentes.

Nous indiquerons ici quelques-uns des caractères de deux mycobactériophages isolés récemment par nous et le résultat des observations que nous avons pu faire.

L'un de ces mycobactériophages (K_1) a été isolé du sol, l'autre (K_2) des excréments de poules.

L'examen au microscope électronique montre que la taille de ces deux phages est un peu différente : K_1 a une tête ronde de 80 m μ de diamètre et une queue de 200 m μ de long (pl., fig. 1), K_2 une tête ronde de 100 m μ de diamètre et une queue de 400 m μ (pl., fig. 2). Les plages formées par K_1 sur la gélose glycinée ensemencée avec une Mycobactérie saprophyte (n° 193) ont un diamètre de 1 à 3 mm, les bords en sont un peu irréguliers.

Le phage K_2 n'est pas actif sur cette même Mycobactérie. Mais au contraire, mis en contact avec la Mycobactérie saprophyte A_1 , il provoque l'apparition de deux sortes de plages (pl., fig. 3).

Les unes ont 2 à 3 mm, les autres 5 mm de diamètre environ. Nous avons supposé tout d'abord qu'il existait dans la souche K_2 deux phages différents. Le repiquage de chaque variété de plage prise séparément donne toujours naissance aux grandes et aux petites plages.

Nous avons étudié les spectres d'action des phages K_1 et K_2 à la dilution de 10^{-8} au centimètre cube sur 41 souches de Mycobactéries (26 saprophytes, 3 aviaires, 3 bovines, 8 humaines, 1 de BCG) et 10 souches de *Nocardia*. La recherche a été faite sur gélose glycinée pour les Mycobactéries saprophytes, sur milieu à l'œuf pour les bacilles virulents.

Le tableau I résume les résultats obtenus.

Nous ferons remarquer que les phages K_1 et K_2 n'ont aucune action sur les 10 souches de *Nocardia* employées.

Les milieux contenant du Tween 80 ne sont pas favorables au phénomène de la bactériophagie.

Le phage K_1 résiste au chauffage à 56° C pendant une demi-heure. Après un chauffage de dix minutes à 60° C, on voit la densité initiale de $10^{-3}/\text{cm}^3$ décroître jusqu'à $10^{-4}/\text{cm}^3$. L'activité lytique disparaît totalement après un séjour de cinq minutes à 65° C.

Après action du mycobactériophage K_2 sur la souche saprophyte A_1

TABLEAU I. — Spectres d'action des phages K_1 et K_2 .

MYCOBACTÉRIES	MYCOBACTÉRIOPHAGES	
	K_1	K_2
Mycobactéries saprophytes :		
<i>smegmatis</i> I	—	—
<i>pileh</i> I	—	—
220 I	+	—
193 I	+	—
A_1 I	—	+
607 I	+	—
les autres 20	—	—
Type aviaire 3	—	—
Type bovin 3	—	—
B C G I	—	—
Type humain :		
H ₃₇ Rv I	+	—
H ₃₇ Ra I	+	—
F I	+	—
les autres 5	+	—
<i>Nocardia</i> 10	—	—

on voit apparaître deux sortes de colonies : les unes rugueuses, les autres lisses dans la proportion de 1 R pour 5 ou 10 S (pl., fig. 4).

Toutes les colonies rugueuses sont résistantes et non-lysogènes ; la moitié des colonies lisses sont résistantes et lysogènes, l'autre moitié est sensible au phage K_2 .

Nous avons, par ailleurs, mis en contact des micro-colonies de la souche A_1 avec le phage K_2 en opérant comme suit.

En vingt-quatre heures, la Mycobactérie A_1 donne à la surface du bouillon glyciné dans lequel elle a été ensemencée des colonies si petites qu'elles ne peuvent être aperçues qu'à la loupe. On les prélève et on les transporte à la surface d'une goutte d'eau physiologique stérile déposée sur une lamelle stérilisée elle-même. On porte à l'étuve pendant une demi-heure environ jusqu'à dessiccation.

D'autre part, on fixe avec de la vaseline deux petites lamelles sur une lame (fig. 1 a), de telle sorte qu'elles puissent servir de support à la lamelle déjà préparée. On placera cette dernière en l'inversant de façon que la micro-colonie de Mycobactérie A_1 vienne au contact d'une goutte de bactériophage K_1 déposée au préalable.

On lute l'ensemble de la préparation. On place sous le microscope à contraste de phase chauffé à 37°C .

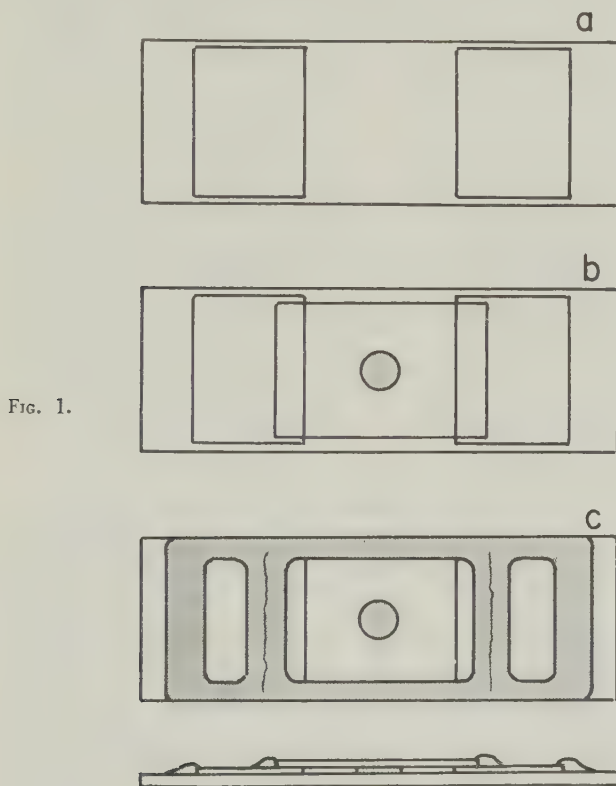


FIG. 1.

Après quatre heures, l'aspect des micro-colonies n'a pas changé : il est le même qu'au début de l'expérience (pl., fig. 5 et 6).

Après neuf heures, les bacilles qui se trouvent à l'extrémité libre de la chaîne commencent à être lysés (pl., fig. 7). Après vingt-quatre heures, presque tous les bacilles composant les micro-colonies se présentent sous l'aspect de « fantômes ». Ceux qui sont placés au centre des micro-colonies paraissent encore normaux (pl., fig. 8).

Ces observations ne confirment pas celles de Takeya et coll. [7].

Nous pensons que la modification graduelle des Mycobactéries par un phage, constatée dans les expériences que nous venons de rap-

porter, est liée à leur mode de développement (Uyeda [8]), à leur âge et à leur activité.

RÉSUMÉ. — Les caractères particuliers, les spectres d'action de deux souches de mycobactériophages isolées du sol et des excréments de poules sont étudiés. L'étude par une technique particulière de l'action des phages sur les Mycobactéries montre que celles-ci sont attaquées graduellement, les germes se trouvant à l'extrémité libre des chaînes le sont en premier. Les bacilles qui leur font suite se modifient un peu plus tard et quelques éléments existant au centre de la micro-colonie, c'est-à-dire à la base d'une chaîne, restent souvent sans changement même après vingt-quatre heures.

SUMMARY

TWO STRAINS OF MYCOBACTERIOPHAGES RECENTLY ISOLATED AND THEIR ACTIVITY ON THE MICRO-COLONIES OF A SAPROPHYTIC MYCOBACTERIUM.

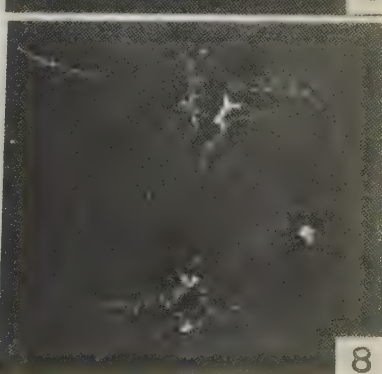
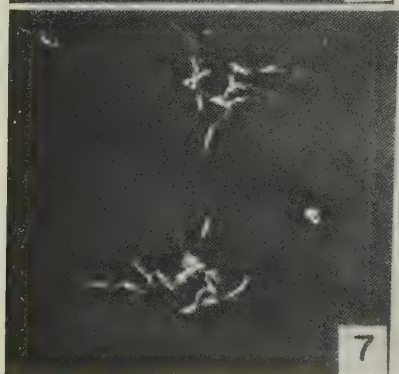
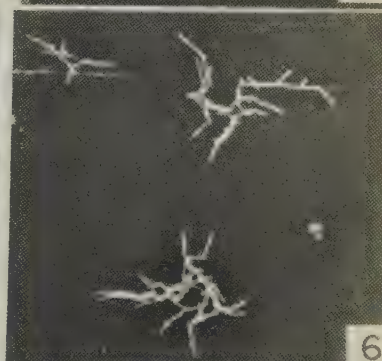
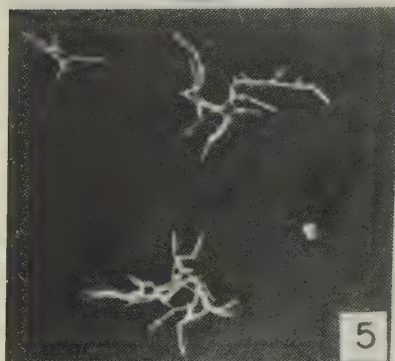
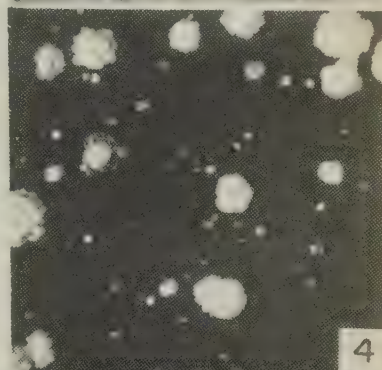
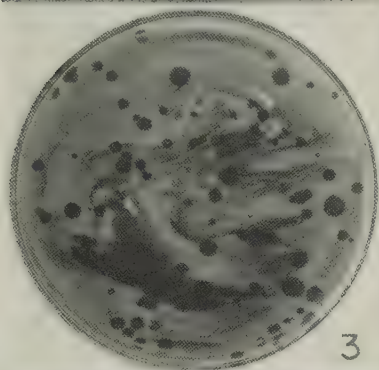
Study of the properties and activity range of two strains of mycobacteriophages isolated from soil and chicken feces. The technique described shows that the Mycobacteria are gradually attacked by the phages, the germs situated at the free end of the chain being first attacked. The other bacteria of the chain are modified later, and a few elements situated in the center of the micro-colonies, i. e. at the base of a chain, often remain unchanged, even after 24 hours.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] BOWMAN (B. U). *J. Bact.*, 1958, **76**, 52-62.
- [2] FROMAN (S.) et coll. *Amer. J. publ. Hlth*, 1954, **44**, 1326-1333.
- [3] GARDNER (G. M.) et WEISER (R. S.). *Proc. Soc. exp. Biol.*, 1947, **66**, 205-206.
- [4] HAUDUROY (P.) et ROSSET (W.). *C. R. Acad. Sci.*, 1948, **227**, 917-918.
- [5] HNATKO (S. I.). *Canad. J. med. Sci.*, 1953, **31**, 462-473 ; *Canad. J. publ. Hlth*, 1954, **45**, 70-72 ; *Canad. J. Microbiol.* 1956, **2**, 39-44.
- [6] PENSO (G.) et ORTALI (V.). *R. C. Inst. sup. Sanita*, 1949, **12**, 903-918.
- [7] TAKEYA (K.) et coll. *J. Bact.*, 1959, **78**, 307-312.
- [8] UYEDA (S.). *Rev. Tub.*, 1955, **19**, 984-1001 et 1957, **21**, 95-104.
- [9] WHITTAKER (E.). *Canad. J. publ. Hlth*, 1950, **49**, 431-436.

LEGENDE DE LA PLANCHE

- | | |
|---|--|
| <p>FIG. 1. — Phage K_1.</p> <p>FIG. 3. — Mycobactérie saprophyte A_1 infectée par le phage K_2. Deux sortes de plages différentes.</p> <p>FIG. 4. — Deux sortes de colonies de Mycobactéries saprophytes A_1 soumises à l'action du phage K_2.</p> <p>FIG. 5. — Des micro-colonies de Mycobactéries A_1 sont placées en contact avec le phage K_2.</p> <p>FIG. 6. — Après quatre heures.</p> | <p>FIG. 2. — Phage K_2.</p> <p>FIG. 7. — Après neuf heures.</p> <p>FIG. 8. — Après vingt-quatre heures.</p> |
|---|--|



CONTRIBUTION A L'ÉTUDE DES CARACTÈRES BIOCHIMIQUES DE *PASTEURELLA PSEUDOTUBERCULOSIS* (BACILLE DE MALASSEZ ET VIGNAL)

par Henri-H. MOLLARET

(avec la collaboration technique de M^{lle} M.-C. DEPLANCHE).

(Institut Pasteur)

Nous avons utilisé pour cette étude 327 souches de *P. pseudotuberculosis* dont la moitié environ était conservée en collection (1) et dont les autres furent isolées en 1959 et 1960. Ces souches provenaient des espèces suivantes :

Homme	20
Singe	14
Lièvre	130
Lapin	20
Cobaye	39
Chat	6
Oiseaux	44
Espèces diverses	54

Sérologiquement, elles se répartissent ainsi :

Type I	225
Type II	59
Type III	12
Type IV	3
Type V	5
Non classables (autcagglutinables)	23

Pour comparaison, nous avons utilisé 15 souches de *P. septica* et 3 souches de *P. pestis* (« Harbin », « A II 22 » et « H III 50 ») respectivement [glycérol +, nitrites +], [glycérol O, nitrites +] et [glycérol +, nitrites O].

(1) Nous devons ces souches à G. Girard, qui en avait assumé la conservation après isolement et typage sérologique. Plusieurs d'entre elles avaient été isolées par K. Saisawa, A. Pfeiffer, C. Truche et gardées plus de trente ans dans le milieu de conservation de ce dernier. Nous remercions le Dr A. Lucas, directeur du Laboratoire central de Recherches vétérinaires du Ministère de l'Agriculture, pour les souches qu'il nous a adressées.

En raison de l'influence de la température de culture sur le comportement de *P. pseudotuberculosis*, toutes les épreuves suivantes ont été effectuées comparativement à 18°, 27° et 37°.

1° ATTAQUE DE L'ESCULINE. — En 1947, Jamieson et Soltys [4], étudiant une souche isolée chez le béliet, ont constaté qu'elle attaquait rapidement l'esculine. Toumanski [14], sur 10 souches étudiées, a constaté que toutes attaquaient l'esculine. Avec 45 souches, Parnas [9] a fait les mêmes constatations en bouillon contenant 1 p. 100 d'esculine.

Nous avons recherché l'action de *P. pseudotuberculosis* en milieu gélosé contenant 1 p. 1 000 d'esculine. Sur 327 souches, 318 ont attaqué l'esculine sans production de gaz en dix heures au maximum et, pour la plupart des souches, avant la deuxième heure. Avec nombre de souches, il fut même possible d'apprécier dans les cinq à dix premières minutes un noircissement autour de la piqure d'ensemencement. Lorsque le noircissement est plus tardif, c'est à 28° qu'il apparaît en premier. Neuf souches n'ont pas attaqué l'esculine en vingt-quatre heures : deux d'entre elles ont provoqué un noircissement tardif (treizième et quinzième jour). Six sont restées définitivement négatives. Une souche, récemment isolée chez un lièvre, était initialement esculine-négative. Après passage par le lapin, cette souche attaqua l'esculine en dix jours ; d'autre part, la culture secondaire apparue après lyse par le bactériophage de la souche initiale nous a donné une souche attaquant l'esculine en huit jours (ce fait est à rapprocher des expériences de Baron, Formal et Spilmann [1] sur le passage de la forme [xylose O, arabinose O] de *Salmonella typhi* à la forme [xylose +, arabinose +] sous l'action du bactériophage).

L'esculine est également attaquée par *P. pestis* en moins de vingt heures. Elle ne l'est pas par *P. septica*.

2° ACTION SUR LE CITRATE DE SODIUM. — En 1952, Piéchaud [10], étudiant une souche de *P. pseudotuberculosis* d'origine humaine, a constaté qu'elle ne cultivait pas sur milieu de Simmons. Knapp [5], utilisant le même milieu avec 14 souches des types I à V, a remarqué que, s'il n'y avait pas de culture à 37°, 3 souches ont donné à 22° une culture minime en dix à vingt et un jours.

A. — Sur milieu de Simmons avec 327 souches nous avons fait les constatations suivantes :

a) A 37°, aucune souche ne s'est développée.

b) A 18°, la plupart des souches des types I, II, III et V ont donné une culture très pauvre à partir du dixième jour en moyenne avec, plus tardivement, un virage franc du milieu.

Ce virage est apparu, en général, en deux à trois semaines. Il fut parfois plus tardif : trente à quarante jours et, plus tard, nous en avons observé aux quarante-sixième, quarante-huitième, cinquante-sixième et soixante-huitième jours.

Le virage est le fait de mutants entraînant l'apparition de rares colonies blanches contrastant avec l'aspect jaunâtre du reste de la culture ;

le nombre de ces colonies varie selon les souches et souvent lors des différents essais avec une même souche, du fait sans doute de la plus ou moins grande quantité d'inoculum.

Le repiquage sur citrate de Simmons de ces colonies raccourcit progressivement les délais de virage jusqu'à quarante-huit heures, comme l'avait déjà constaté Marneffe [8] en 1959. Ces mutants demeurent incapables de cultiver à 37° sur milieu de Simmons.

c) A 28°, une souche sur trois environ ne s'est pas développée ou n'a donné qu'une culture très maigre, sans jamais de virage du milieu. Les deux tiers des souches se sont développés, mais le virage s'est produit sensiblement plus tard qu'à 18°.

d) Le comportement des trois seules souches de *P. pseudotuberculosis* du type IV que nous possédions a été légèrement différent : si elles ne se sont jamais développées à 37°, elles ont, par contre et lors d'un très grand nombre d'essais, entraîné un virage du milieu dans des délais en général plus courts que ceux observés avec la plupaart des souches des autres types. Bien qu'à certains essais le virage ne soit apparu qu'au quinzième jour, nous l'avons obtenu dans la plupart des cas entre deux et quatre jours.

B. — Sur milieu de Christensen (Ewing [2]) : les résultats ont été identiques, y compris la précocité du virage par les souches du type IV.

C. — En bouillon citraté à 1 p. 100 (Ewing [2]), la plupart des souches de *P. pseudotuberculosis* attaquent le citrate en quinze jours à 18°.

D. — *P. pestis* et *P. septica* ne modifient pas ces trois milieux.

3° FERMENTATION DU MALONATE DE SODIUM. — En bouillon malonate de Leifson (Ewing [2]), les souches appartenant aux types I, II, III et V de *P. pseudotuberculosis* n'ont jamais attaqué le malonate, quelle que fût la température de culture. Par contre, nos trois souches du type IV ont entraîné le virage du milieu en quarante-huit heures à 28°. Cette action est plus lente (quatre à sept jours) à 18° ; elle ne se produit pas à 37°.

Nous n'avons pas observé de modifications avec *P. pestis* et *P. septica*.

4° FERMENTATION DES TARTRATES. — Le D-tartrate (Ewing [2]), les acides L et I tartriques ne sont pas attaqués par *P. pseudotuberculosis*, *P. pestis* et *P. septica*.

5° RECHERCHE DE LA LYSINE-DÉCARBOXYLASE, DE LA TRYPTOPHANE-DÉSAMINASE ET DE LA TRANSFORMATION DE LA PHÉNYL-ALANINE EN ACIDE PHÉNYL-PYRUVIQUE (Le Minor [6]). — Ces réactions ont été négatives à 18°, 27° et 37° avec toutes les souches de *P. pseudotuberculosis*, ainsi qu'avec *P. pestis* et *P. septica*.

6° EPREUVE DE BRAUN (Le Minor [6]). — Elle a été étudiée par Knapp [5] qui l'a trouvée négative. Lindemann, Wintsch et Hedin-ger [7] ont fait les mêmes constatations sur deux souches humaines. Nous confirmons ces résultats. Aucune de nos souches de *P. pseudo-*

tuberculosis ne s'est développée en milieu contenant 15 cm³ p. 1 000 d'une solution à 0,5 p. 100 de cyanure de potassium. *P. pestis* ne se développe pas non plus dans ce milieu. Par contre, sur quinze souches de *P. septica*, quatre ont donné une culture en trente-six heures, quatre autres en quarante-huit heures.

7° DÉCOMPOSITION DE L'URÉE. — Cette action a été démontrée en 1950 par Fauconnier [3], en milieu de Ferguson et en milieu urée-indole (Roland-Bourbon-Szturm) et confirmée en 1955 par Thal et Chen [43] sur milieu de Christensen-urée. Nous avons utilisé ces trois milieux ainsi que le bouillon placenta-urée, préconisé par Sohler [44] pour la mise en évidence de l'uréase chez certains *Corynebacterium*, et dont la formule est la suivante :

Bouillon placenta (Sohrab [42])	100 cm ³
Solution d'urée à 50 p. 100	5 cm ³
Solution de rouge de crésol à 0,4 p. 100	5 cm ³

En milieu urée-indole et en milieu de Ferguson, nous avons observé le virage en moins de quatre heures comme l'a montré Fauconnier, le plus souvent dans l'heure, parfois en quinze minutes, voire même presque immédiatement. Dans ces délais, la température ne modifie pas la rapidité de la réaction. Par contre, avec quelques souches donnant une réaction tardive, c'est toujours à 37° que le virage apparaît en premier. Dans ces cas, le décalage selon la température est habituellement net : par exemple, virage en six heures à 37° et en vingt heures à 18°.

Sur milieu de Christensen le virage apparaît vers la vingtième heure comme l'ont observé Thal et Chen ; la température ne modifie pas ce délai.

En bouillon placenta-urée, le virage débute vers la sixième heure à 37° et toujours plus tardivement à 28° et surtout à 18°. Ce dernier milieu nous a donné des résultats plus constamment positifs que les trois autres : ainsi, la souche 35-II que Fauconnier, en 1950, avait trouvée négative en milieu urée-indole et en milieu de Ferguson et qui nous est également apparue négative sur ces deux milieux comme sur milieu de Christensen, s'est révélée positive en cinq jours, en milieu placenta (les témoins non additionnés d'urée n'ayant bien entendu pas viré).

D'autre part, trois souches récemment isolées (230-I, 231-I et 232-I) que nous avons trouvées tardivement positives en milieux urée-indole, de Ferguson et de Christensen (plus de vingt-quatre heures et, pour l'une d'entre elles, plus de quarante-huit heures), se sont montrées par contre, dès l'isolement, positives en bouillon placenta (les repiquages successifs de ces souches sur gélose en ont progressivement réduit pour deux d'entre elles les délais de virage en milieu urée-indole et milieu Ferguson à six heures, à partir du troisième repiquage et à quatre heures, à partir du huitième ; ceci explique sans doute que nous ayons trouvé positive en quatre heures, en milieux urée-indole et de Ferguson, la souche 25-II qu'en 1950, Fauconnier avait trouvée négative sur ces mêmes milieux).

L'attaque de l'urée par *P. pseudotuberculosis* est donc un caractère constant chez les 327 souches de ce germe que nous avons examinées ;

si 4 seulement ont donné un virage tardif sur milieu urée-indole et milieu de Ferguson et si une seule resta définitivement négative sur ces mêmes milieux, toutes se sont montrées capables de décomposer l'urée en bouillon placenta.

Sur les quatre milieux utilisés, *P. pestis* et *P. septica* se sont montrées dépourvues d'uréase.

RÉSUMÉ. — Les différents caractères constatés sont rassemblés dans le tableau suivant.

	<i>P. pseudotuberculosis</i>					<i>P. pestis</i>	<i>P. septica</i>
	I	II	III	IV	V		
Esculine	+	+	+	+	+	+	o
Milieu de Simmons :							
à 37°	o	o	o	o	o	o	o
à 18° et 27°	tardivement +						
Malonate	o	o	o	+ à 27°	o	o	o
Tartrates	o	o	o	o	o	o	o
Lysine décarboxylase	o	o	o	o	o	o	o
Tryptophane désaminase	o	o	o	o	o	o	o
Phénylalanine	o	o	o	o	o	o	o
K. C. N.	o	o	o	o	o	o	variable
Urée sur :							
Ferguson, Urée-indole, Christensen	+ (rares lenteurs ou exceptions)					o	o
Placenta	toujours +						

L'influence de la température sur nombre de caractères bien connus de *P. pseudotuberculosis* s'exerce également sur le comportement de ce germe vis-à-vis de l'urée, du citrate et du malonate de sodium.

Nous n'avons constaté aucune différence selon l'origine des souches de *P. pseudotuberculosis* étudiées.

La fermentation du malonate est le seul caractère biochimique propre au type IV de *P. pseudotuberculosis*, si particulier par ailleurs.

L'attaque rapide de l'esculine par *P. pestis* comme par *P. pseudotuberculosis* contraste avec son absence de fermentation par *P. septica*.

En ce qui concerne la différenciation entre *P. pestis* et *P. pseudotuberculosis*, notre étude confirme la valeur de la mise en évidence de l'uréase de *P. pseudotuberculosis*, caractère qui n'a jamais fait défaut sur les souches étudiées. Si quelques rares souches ont donné une réponse tardive ou négative sur certains milieux, nous n'avons jamais rencontré d'exception en bouillon placenta. En pratique courante, les milieux de Ferguson et urée-indole gardent néanmoins toute leur valeur.

SUMMARY

CONTRIBUTION TO THE STUDY OF THE BIOCHEMICAL PROPERTIES
OF *Pasteurella pseudotuberculosis* (MALASSEZ' AND VIGNAL'S BACILLUS).

The properties observed in the present experiments are summed up in the table.

Temperature, which has an action on many well-known properties of *P. pseudotuberculosis*, influences also its comportment towards urea, and sodium citrate and malonate.

No difference according to the origin of the strains studied could be demonstrated.

Malonate fermentation is the only biochemical property of *P. pseudotuberculosis* type IV, apart from many other peculiar characters.

Esculine is rapidly fermented by *P. pestis* and *P. pseudotuberculosis*. On the contrary it is not fermented by *P. septica*.

The experiments confirm the value of the demonstration of urease in *P. pseudotuberculosis* to differentiate it from *P. pestis*: all strains of *P. pseudotuberculosis* studied were urease-positive. If, for a few strains, the reaction was delayed or negative on certain media, no exception was met with in placenta-broth. However, in routine laboratory practice, Ferguson's and urea-indole media are quite reliable.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] BARON (L. S.), FORMAL (S. B.) et SPILMANN (W.). *J. Bact.*, 1959, **69**, 177-183.
- [2] EWING (W. H.). *Enterobacteriaceae. Biochemical methods for group differentiation*. 1 vol., Atlanta, 1960.
- [3] FAUCONNIER (J.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1950, **79**, 104-105.
- [4] JAMIESON (S.) et SOLTYS (M. A.). *Vet. Rec.*, 1947, **59**, 351-353.
- [5] KNAPP (W.). *Ergebn. Mikrobiol.*, 1959, **26**, 196-269.
- [6] LE MINOR (L.). *Le diagnostic de laboratoire des Entérobactéries*. 1 vol., Ed. de la Tourelle, Saint-Mandé, 1959.
- [7] LINDEMANN (J.), WINTSCH (L.) et HEDINGER (C.). *Schweiz med. Wschr.*, 1960, **90**, 364.
- [8] MARNEFFE (H.). [Résultats non publiés.]
- [9] PARNAS (J.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1961, **100**, 691.
- [10] PIÉCHAUD (M.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1952, **83**, 420-421.
- [11] SOHIER (R.). [Communication personnelle.]
- [12] SOHRAB (H.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1947, **73**, 916-918.
- [13] THAL (E.) et CHEN (T. H.). *J. Bact.*, 1955, **69**, 103-104.
- [14] TOUMANSKI (V. M.). *Pseudotuberculose*. 1 vol., 82 p., Moscou (M. E. D. G. I. Z.), 1958.

L'ÉPREUVE ESCULINIQUE **DANS LE DIAGNOSTIC DE LA PESTE** **ET DE LA PSEUDOTUBERCULOSE**

par J. PARNAS (*).

Une épreuve simple, basée sur l'attaque de l'esculine, donne des résultats identiques avec *P. pestis* et avec *P. pseudotuberculosis*, mais permet de séparer ces deux espèces de *Pasteurella sensu stricto* ainsi que d'autres bactéries susceptibles d'être isolées au cours de recherches systématiques portant sur les rongeurs (notamment *Salmonella* et *Brucella*).

DÉNOMINATION DE LA SOUCHE	PROVENANCE DE LA SOUCHE	RÉSULTAT DE L'ÉPREUVE ESCULINIQUE	NOMBRE DE SOUCHES
<i>Pasteurella pseudotuberculosis</i> .	Lapin	++	5
	Lièvre	++	10
	Rat	++	5
	Cobaye	++	5
	Volaille	++	10
	Mouton	++	5
	Souris	++	4
	Homme	++	1
<i>Pasteurella bovis</i>	Vache	—	5
— <i>avium</i>	Volaille	—	5
— <i>equi</i>	Cheval	—	5
— <i>suis</i>	Porc	—	5
— <i>ovis</i>	Mouton	—	3
— <i>cuniculi</i>	Lapin	—	2
— <i>pestis</i>	Homme	++	10
— <i>pestis</i>	Rat	++	10
<i>Salmonella enteritidis</i> Gartner Wroclaw	Bétail	—	5
<i>Salmonella</i> Schotmüller	Homme	—	2
— <i>suipestifer, gallina- rum, abortus ovis, equi</i>		—	10
<i>Brucella bovis, suis, melitensis</i> .		—	10
<i>Bact. proteus vulgaris</i> O × 19 ..		— ou + ou ++	

(*) Chaire de Microbiologie médicale de l'Académie de Médecine, Section des Anthropozoonoses de l'Institut d'Etat de Médecine du Travail et d'Hygiène rurale, Lublin, ul. Czwartek 4a, Pologne.

L'épreuve consiste à ensemençer la souche examinée dans du bouillon contenant 1 p. 100 d'esculine. Quand la culture s'est développée, on ajoute une goutte de chlorure de fer. Dans le bouillon stérile témoin et dans les tubes de bouillon ensemençés avec des bactéries n'attaquant pas l'esculine, l'addition de chlorure de fer fait apparaître un sédiment blanc et épais. Ce sédiment est noir dans les tubes témoins positifs (ensemencés avec des entérocoques).

Les résultats sont nets et rapidement acquis. Les résultats obtenus avec la collaboration du Centre de Saratow (U. R. S. S.) pour l'étude de la peste sont résumés par le tableau ci-joint.

Les résultats notés sur ce tableau peuvent être interprétés dans un sens favorable à l'hypothèse selon laquelle le bacille de la peste serait une variété de celui de la pseudotuberculose, l'espèce constituée par ces deux variétés ne devant pas être rattachée au genre *Pasteurella*.

Les communications suivantes paraîtront en *Mémoire* dans les *Annales de l'Institut Pasteur* :

Effets cytopathogènes des adénovirus type 5. — I. Aspects morphologiques, par M^{lle} Y. CHARDONNET, M. PRUNIÉRAS et R. SOHIER.

Les inclusions intranucléaires éosinophiles d'aspect cristallin, produites par les adénovirus des types 5 et 6, par A. BETZ.

La réaction de fixation du complément pour un diagnostic précoce de la poliomyélite, par M^{me} J. VIRAT.

Dosage du pouvoir bactéricide des sérums par mesure de la respiration bactérienne. Application à l'étude des propriétés des sérums hypergamma-globuliniques, par R. VARGUES, B. GRENIER et B. MORAUD.

Essais d'appréciation de la valeur biologique des humus, par J. POCHON, M^{lle} M.-A. CHALVIGNAC, L. LEBORGNE et P. TARDIEUX.

Sensibilité de bactéries de différents genres au thiophénicol, par A.-L. COURTIEU, C. LONGERAY, Cl. MIRAILLET, M.-F. COLOMBET et A. PADIOU.

Etude sérologique de 599 souches de staphylocoques pathogènes isolées en France. Répartition et fréquence relative des différents types, par J. PILLET, B. ORTA, M. FOUCAUD et M. PERRIER.

Contribution à l'étude de l'inoculation par voie oculaire de *Pasteurella pseudotuberculosis* (bacille de Malassez et Vignal), par H.-H. MOLLARET.

Mise en évidence d'antigènes de groupes sanguins ABO et Rh chez les singes chimpanzés, par A. ANDRÉ, G. COURTOIS, G. LENNES, G. NINANE et P. M. OSTERRIETH.

Les groupes sanguins des chimpanzés, par A. EYQUEM.

Groupes sanguins des porcs, par A. KACZMAREK, M^{me} L. PODLIACHOUK, P. MILLOT et A. EYQUEM.

AVIS

L'Academic Press, Londres et New York (111 Fifth avenue, New York 3), vient de faire paraître le premier fascicule du nouveau *Journal of theoretical Biology*, dont le D^r J. F. Danielli, King's College, Londres, est le rédacteur en chef. Le D^r Danielli est assisté d'un comité international composé de : M. Calvin, University of California, Berkeley, B. Commoner, Washington University, St-Louis ; C. de Duve, Laboratoire de Chimie physiologique, Louvain ; A. L. Fessard, Collège de France, Paris ; D. Mazia, University of California, Berkeley ; J. Monod, Institut Pasteur, Paris ; C. H. Waddington, Institute for animal Genetics, Edimbourg ; M. Ycas, State University of New York Upstate medical Center, Syracuse ; J. Z. Young, University College, Londres.

Ce nouveau périodique international publiera des travaux originaux sur la biologie théorique : théories générales, théories des processus ou phénomènes spécifiques, discussions de théories ou de techniques.

Les manuscrits doivent être soumis au rédacteur en chef ou à un membre quelconque du Comité. Ils peuvent être rédigés en français, anglais ou allemand. Les manuscrits rédigés en français ou en allemand devront être accompagnés d'un résumé en anglais. Les auteurs recevront cinquante tirés à part de chacun de leurs mémoires.

LIVRES REÇUS

R. F. S. Schilling. — *Modern trends in occupational health.* 1 vol., 313 p., Butterworth édit., Londres, 1960. Prix : 67 s. 6 d.

Avec le développement rapide de l'industrie au cours de ces dernières années, l'étude des dangers professionnels et des risques que peuvent entraîner les divers métiers pour ceux qui les exercent, est devenue de plus en plus nécessaire. De nombreux collaborateurs passent en revue, dans ce volume, les divers aspects de la question : affections pulmonaires, cancers, maladies mentales, danger des radiations, dommages causés par le bruit, accidents professionnels, traitement des plaies et des brûlures, etc. Des statistiques sont données et les mesures de sécurité à prendre sont exposées.

H. T.

M. B. Jacobs et M. Gerslein. — *Handbook of microbiology.* 1 vol., 322 p., van Nostrand Cy, édit., Princeton, 1960. Prix : \$ 8,50.

Ce livre est une compilation destinée à fournir rapidement des renseignements très divers aux microbiologistes professionnels. On y trouve sous une forme abrégée, présentés par ordre alphabétique ou en tableaux : une classification des bactéries et des champignons ainsi que leurs principaux caractères distinctifs, des techniques de coloration et de culture, les modes de préparation et d'emploi de nombreux réactifs, des notions sur les maladies dues aux bactéries, aux rickettsies et aux virus, sur les toxines, antitoxines, vaccins, antibiotiques, etc.

P. T.

M. Florkin et H. S. Mason. — *Comparative biochemistry. A comprehensive treatise.* Vol. I. *Sources of free energy*, 1 vol., 590 p. Academic Press, New-York et Londres. Prix : \$ 18.00.

Cet ouvrage, le premier d'une série de six volumes, concerne les différentes sources d'énergie libre dans le monde vivant. Il comprend onze chapitres, chacun étant traité par des spécialistes différents.

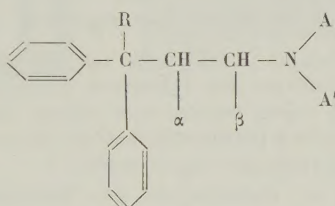
Après une introduction de biochimie comparée et quelques notions fondamentales de thermodynamique des systèmes vivants, le chapitre III concerne les différents mécanismes d'oxydation des acides gras. Le chapitre IV traite ensuite des anhydrides d'acide phosphorique et d'autres composés riches en énergie. D'autres composés non moins importants, sources d'énergie chimique, font l'objet du chapitre suivant : ce sont les composés d'ammonium quaternaire et de sulfonium. L'étude du phototropisme, de la répartition et de l'évolution des systèmes visuels est ensuite abordée (chapitres VI et VII). Mais certains microorganismes tirent leur énergie de l'oxydation de composés inorganiques (composés azotés et soufrés en particulier). Ces différents processus, propres aux bactéries autotrophes, sont décrits dans le

chapitre VII. Les deux chapitres suivants traitent de la glycolyse et du transport d'électrons. Enfin, l'ouvrage se termine par une étude de l'utilisation de l'énergie thermique par les organismes vivants.

Cet ouvrage, bien présenté et doté d'une abondante bibliographie, sera très utile à tous les travailleurs en biochimie. B. H.

A. J. Janssen. — *Synthetic analgesics. Part I: Diphenylpropylamines.*
1 vol., 183 p. Pergamon Press, Oxford, Londres, New-York, Paris,
1960. Prix : 45 s.

Cet ouvrage est une mise au point de nos connaissances actuelles concernant la synthèse, les propriétés physiques, chimiques, pharmacologiques et surtout analgésiques des dérivés de la diphénylpropylamine de structure générale :



L'auteur classe rapidement les différentes méthodes d'étude des analgésiques et justifie le choix des stimuli nociceptifs correspondants. Les résultats des essais sont présentés sous forme de tableaux comparatifs et le lecteur pourra juger de l'activité des produits éprouvés par rapport aux standards méthadone, morphine, pethidine et codéine.

Les substitutions des diphénylpropylamines en R sont systématiquement exposées. C'est ainsi que sont passés en revue les corps où R = H (3 : 3 diphénylpropylamines), OH (alcools tertiaires), CHOH - ALC (alcools secondaires), (CH₂)_n OH (alcools primaires), C ≡ N (nitriles), CONH₂ (amides primaires), CO - NHR' (amides secondaires), CO NR'R' (amides tertiaires), COOH (acides), COCl (Chlorures d'acides) COOR (esters d'acides), OCOR' (esters d'alcools tertiaires), CHO-COR'R' (esters d'alcools secondaires), COR (cétones), C-N-H R' (cétamines), CN COR''R' (aryl cétimines), SO₂R' (sulfones). G. L.

L. E. R. Picken. — *The organization of cells and other organisms.*
1 vol., 629 p., 34 pl. The Clarendon Press, Oxford, University Press.
Prix : \$ 84.

Ce volume est divisé en dix chapitres : l'organisation des cellules et autres organismes, l'organisation des virus, l'organisation de certains schizomycètes, noyau, propriétés générales du cytoplasme, particules cytoplasmiques, structures fibrillaires, surfaces et membranes, matériel extracellulaire, passage à la multicellularité.

Pour juger un ouvrage, l'analyste regarde comment sont traités les sujets sur lesquels il est le moins incompetent. L'étudiant ou le chercheur qui désirent s'instruire sur le bactériophage, sur la lysogénie,

sur la sexualité des bactéries ne trouveront, sur ces sujets, que des exposés malheureusement très incomplets, où aucun des problèmes importants n'est discuté comme il se devrait. De plus, la bibliographie est arrêtée à 1956 ou 1957, et ce livre, qui paraît en 1960, est en retard sur d'autres revues ou traités parus en 1958-1959 et 1960, où les sujets sont traités par des spécialistes.

Quels que soient l'érudition et le sens critique d'un auteur, il lui est difficile de dominer des problèmes aussi complexes et aussi variés que ceux qui sont traités dans ce livre. Ces remarques n'excluent pas la possibilité que des sujets sur lesquels l'analyste est incompétent soient discutés de façon satisfaisante. L'auteur déclare lui-même que son livre est une compilation, et sur ce point-là, je pense, tout le monde sera d'accord.

A. L.

Lydia Mesrobeanu et Eugeniu Paunescu. — *Fiziologie Bacteriana*. Edité par l'Académie de la République populaire de Roumanie.

Ce traité de Physiologie Bactérienne est un ouvrage complet, qui se distingue par l'abondance des références bibliographiques, ainsi que par la multitude des sujets traités, avec talent, par des auteurs bien connus pour leurs travaux personnels dans ce domaine.

Retenons comme principaux sujets traités :

Origine, évolution et classification des bactéries. Cytologie bactérienne, constitution chimique des bactéries. Propriétés physico-chimiques des bactéries. L'action des agents physiques et chimiques sur les bactéries. Les principes de la coloration bactérienne. Le métabolisme bactérien. La multiplication des bactéries. La variabilité et l'hérédité des bactéries. Les relations entre l'hôte et le germe infectieux. Le rôle des bactéries dans le cycle des éléments.

E. B.

U. Berger. — *Die Treponemen der Mundhöhle und ihre Bedeutung für die Pathogenese der oralen Fusospirochätosen*. 1 vol., 139 p., Johann Ambrosius Barth, édit., Leipzig, 1958.

Après avoir, dans sa préface, signalé l'importance des Fusospirochètes de la cavité buccale et les raisons pour lesquelles nos connaissances à leur sujet ont si lentement progressé au cours des dernières années, l'auteur étudie d'abord leur place dans la systématique, puis les techniques de leur mise en évidence, leur culture, la conservation des souches, les propriétés biochimiques de ces microorganismes, leur résistance aux agents physiques et chimiques, la toxinogenèse, le pouvoir pathogène, leur comportement vis-à-vis des mécanismes de défense non spécifiques de l'hôte (phagocytose, pouvoir bactéricide du sérum, lysozyme, etc.). Chacun des chapitres comporte un bref résumé et la bibliographie de l'ensemble du livre contient 450 titres.

H. T.